



Endotheliale Funktionsstörung: Wirkung von Auto-Antikörpern (ANCA)

Catharina Pölzelbauer

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med.vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. med.vet. habil. Georg Baljer

und

Zentrum für Innere Medizin am Universitätsklinikum Gießen und Marburg
Betreuer: Prof. Dr. med. Ulf Sibelius

**Endotheliale Funktionsstörung:
Wirkung von Auto-Antikörpern (ANCA)**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med.vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Catharina Pölzelbauer
Tierärztin aus Stuttgart

Gießen 2010

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan

Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Prof. Dr. Ulf Sibelius

Tag der Disputation:

08. Dezember 2010

Meinen Eltern
meiner Freundin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
2. Schrifttum	11
2.2 Systemische Vaskulitiden	11
2.2.1 Primäre systemische Vaskulitiden	11
2.2.2 Sekundäre systemische Vaskulitiden	12
2.3 ANCA - assoziierte systemische Vaskulitiden.....	13
2.3.1 Wegener´sche Granulomatose.....	13
2.3.3 Mikroskopische Polyangiitis	14
2.3.2 Churg-Strauss-Syndrom	14
2.4 Systemische Vaskulitiden beim Tier.....	15
2.5 ANCA (“anti-neutrophil-cytoplasmic-antibodies”)	16
2.6 Endotheliale Barriere: Funktion und Regulation	18
2.7 Die Rolle neutrophiler Granulozyten in der Vaskulitis.....	27
2.8 Hypothetisches Modell der ANCA abhängigen leukozytär-endothelialen Interaktion .	34
3. Materialien und Methoden.....	36
3.1 Materialien und Lösungen.....	36
3.1.1 Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten	36
3.1.2 Durchflußzytometrie	36
3.1.3 Messung granulozytärer Funktionsparameter „respiratory burst“	36
3.1.4 Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen aus der Nabelschnurvene	37
3.1.5 Isolierung und Kultivierung von Rattenlungen Endothelzellen.....	37
3.1.6 Passagierung und Kultivierung von Endothelzellen	38
3.1.7 Messung der Makromolekülpermeabilität	38
3.1.8 Verbrauchsmaterialien	39
3.2 Methoden.....	40
3.2.1 Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten	40
3.2.2 Analyse der Proteinase 3 Membranexpression: Durchflußzytometrie.....	41
3.2.3 Messung granulozytärer Funktionsparameter: „respiratory burst“	41
3.2.4 Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen aus der Nabelschnurvene	42
3.2.5 Isolierung und Kultivierung von Koronar-Endothelzellen aus der Ratte.....	43
3.2.6 Isolierung und Kultur von Lungen-Endothelzellen aus der Ratte	43
3.2.7 Passagierung und Aussaat von Endothelzellen auf Filtermembranen	44
3.2.8 Messung der Makromolekülpermeabilität endothelialer Monolayer	45

3.2.9 Statistische Auswertung	47
4. Ergebnisse	48
4.1 Übersicht	48
4.2 Membranexpression von Proteinase 3 auf neutrophilen Granulozyten	50
4.3 ANCA induzierte Aktivierung des neutrophilen „respiratory burst“	51
4.4 Makromolekülpermeabilität endothelialer Monolayer.....	53
4.4.1 Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC)	53
4.4.2 Ratten-Koronar-Endothelzellen (RCEC)	56
4.4.3 Ratten-Lungen-Endothelzellen (RLEC).....	58
4.4.4 Isotyp Kontroll-Antikörper: Einfluss auf Permeabilität von RLEC-Monolayern...	60
4.4.5 Blockade des endothelialen ICAM-1-Rezeptors	62
4.4.6 Hemmung granulozytärer Reaktionsprodukte	64
5. Diskussion	66
5.1 Entwicklung der Fragestellung.....	66
5.2 Die Membranexpression von Proteinase 3 auf neutrophilen Granulozyten ist aktivierungsabhängig	67
5.3 Anti-PR3-Antikörper aktivieren neutrophile Granulozyten in-vitro.....	67
5.4 Heterogenität des vaskulären Endothels: unterschiedliches Reaktionsmuster auf die Interaktion mit ANCA stimulierten Granulozyten	68
5.4.1 makrovaskuläres Endothel: HUVEC	68
5.4.2 mikrovaskuläres Endothel: RCEC	70
5.4.3 mikrovaskuläres Endothel: RLEC.....	71
5.5 Mechanismen, die zur ANCA induzierten, PMN vermittelten Modifikation der endothelialen Barriere führen.....	73
5.5.1 Anti-PR3-Antikörper binden spezifisch an neutrophile Granulozyten	73
5.5.2 Adhäsion der Granulozyten am Endothel ist Voraussetzung für die Modifikation der endothelialen Barriere	74
5.5.3 Die granulozytäre ROS-Freisetzung schädigt die endotheliale Integrität	76
5.6 Modell der ANCA abhängigen leukozytär-endothelialen Interaktion	79
6. Zusammenfassung.....	81
7. Summary	82
8. Literaturverzeichnis.....	83
9. Danksagung.....	97
10. Erklärung.....	98

Liste der verwendeten Abkürzungen

AASV	ANCA-assoziierte systemische Vaskulitis
ALI	acute lung injury
ANCA	anti-neutrophil cytoplasmic antibodies
ARDS	acute respiratory distress syndrome
c-ANCA	zytoplasmatische oder classic ANCA
CCS	Churg-Strauss-Syndrom
CD	cluster of differentiation
cPR3	complementary PR3
DAG	diacylglycerol
DAH	diffuse alveoläre Hämorrhagie
DPI	Diphenyleneiodium chloride
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FIP	feline infektiöse Peritonitis
fMLP	n-formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin
FPR	formyl peptide receptor
FPRL-1	low affinity formyl peptide receptor-like-1
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
HOCl	Hypochlorsäure
HPMVEC	Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cell
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IGSF	Immunglobulin Superfamilie
IIF	indirekter Immunfluoreszenz-Test
IL	Interleukin
IP3	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
LFA	lymphocyte function-associated antigen
LTB ₄	Leukotrien B ₄
MAP-Kinase	mitogen-activated protein kinase

MLC	Myosin-Light-Chain
MPA	Mikroskopische Polyangiitis
MPO	neutrophile Myeloperoxidase
mPR3	membranöse Proteinase 3
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NO°	Nitritoxid
O ₂ ⁻	Superoxidanion
OH°	Hydroxylradikal
ONOO°	Peroxynitritanion
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
p-ANCA	perinukleäre ANCA
PECAM	platelet-endothelial cell adhesion molecule
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC,-B	Protein-Kinase-C,-B
PLC,-D,-A ₂	Phospholipase C,-D,-A ₂
PMN	polymorphkernige Neutrophile
PP1	Phosphatase-1
PR3	Proteinase 3
PS	Phosphatidylserin
PTU	Propylthiouracil
RCEC	Rat Coronary Endothelial Cell
RLEC	Rat Lung Endothelial Cell
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPGN	rapid-progressive Glomerulonephritis
SOD	Superoxid-Dismutase
SRMA	steroid responsive meningitis-arteritis
SVV	small vessel vasculitis
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor α
TRALI	transfusion related acute lung injury
VECAM	vascular cell adhesion molecule
vWF	von-Willebrand-Faktor
WG	Wegener`sche Granulomatose

1. Einleitung

Systemische Vaskulitiden sind geprägt durch charakteristische Entzündungsprozesse in den Gefäßwänden, die sich histologisch in einer fibrinoiden Nekrose der Intima und Media mit Leukozyteninfiltration zeigen (1). In deren Folge können Stenosen und Gefäßverschlüsse auftreten. Bei den primären oder idiopathischen Vaskulitiden sind die Gefäßläsionen die einzigen und vorherrschenden Veränderungen, sie stehen nicht in Zusammenhang mit einer Grunderkrankung (2).

Vaskulitiden können sowohl nach der Größe der betroffenen Gefäße eingeteilt werden als auch nach dem Auftreten von Auto-Antikörpern (ANCA: „anti-neutrophil cytoplasmic antibodies“), deren Zielantigene granulozytäre Oberflächenstrukturen sind (3, 4).

Zu den ANCA-assoziierten Vaskulitiden zählt die Wegener'sche Granulomatose, eine Erkrankung, die klinisch geprägt ist durch eine nekrotisierende und granulomatöse Entzündung der kleinen Gefäße. Die Lunge ist, neben der Niere, der Hauptmanifestationsort der Wegener'sche Granulomatose (3). Mit der Einführung der Chemotherapie, bestehend aus Kortikosteroiden und Cyclophosphamiden, hat sich die Überlebenszeit der betroffenen Patienten deutlich verlängert, dennoch kommt es unter Umständen zu fulminanten Verlaufsformen mit dem klinischen Bild des akuten Lungenversagens (5).

Eine Gruppe der ANCA, die c-ANCA oder „classic ANCA“, besitzen eine hohe Sensitivität und Spezifität für die Wegener'sche Granulomatose, in den meisten Fällen korreliert eine Verschlechterung des Krankheitsbildes mit einem Anstieg des c-ANCA Titers (6, 7).

Zielantigen der c-ANCA ist die neutrophile Proteinase 3, eine Serinprotease, die in den Granula der neutrophilen Granulozyten gespeichert wird und nach Aktivierung der Granulozyten vermehrt auf der Zelloberfläche exprimiert wird (6). *In-vitro* induzieren ANCA bei voraktivierten neutrophilen Granulozyten die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und enzymatischer Metaboliten (8).

Neben ihrer diagnostischen Bedeutung wurde so eine pathogenetische Funktion bei der Entstehung der ANCA-assoziierten Vaskulitiden vermutet, wobei der genaue Pathomechanismus noch nicht vollständig geklärt ist.

Es wird angenommen, dass es über eine ANCA induzierte Freisetzung neutrophiler reaktiver Sauerstoffspezies und enzymatischer Metaboliten zu einer Schädigung des Endothels mit nachfolgender Funktionsstörung der endothelialen Barriere und vermehrtem Übertritt von Makromolekülen, Leukozyten und Flüssigkeit in das Interstitium kommt.

In der vorliegenden Arbeit soll nun in einem Cokultur-Modell die Wirkung von ANCA aktivierten Granulozyten auf die endotheliale Barrierenfunktion untersucht werden. Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet: Unter welchen Bedingungen exprimieren isolierte humane Granulozyten das c-ANCA Zielantigen, die Proteinase 3 auf der Membranoberfläche, und führt die Interaktion mit c-ANCA zu einer Aktivierung der granulozytären reaktiven Sauerstoffspezies-Sekretion?

Kommt es durch c-ANCA aktivierte Granulozyten zu einer Änderung der endothelialen Barrierenfunktion und sind diese Effekte abhängig von der Adhäsion der Granulozyten am Endothel? Zudem wurde die Möglichkeit einer pharmakologischen Intervention in das System über eine Hemmung der reaktiven Sauerstoffspezies-Freisetzung überprüft.

.

2. Schrifttum

2.2 Systemische Vaskulitiden

1866 erstmals durch Kussmaul und Maier als entzündliche Veränderung der Arterien mit Verengung des Gefäßlumens und Aneurysmenbildung beschrieben (9) sind systemische Vaskulitiden Krankheitsbilder, die durch charakteristische Entzündungsprozesse in den Gefäßwänden geprägt sind. Histologisch zeigt sich eine fibrinoide Nekrose der Intima und Media mit Leukozyteninfiltration (1). Diese Läsionen können zu Aneurysmabildung, Stenosen oder vollständigem Verschluss des Gefäßes führen und letztlich zu einer Störung der Blutversorgung des betroffenen Organs (10). Bei einer primären oder idiopathischen Vaskulitis sind die Gefäßläsionen die vorherrschenden und einzigen Veränderungen und die Krankheitsursache bleibt unklar. Tritt eine Vaskulitis in Zusammenhang mit einer Grunderkrankung auf, spricht man von einer sekundären Vaskulitis (2).

2.2.1 Primäre systemische Vaskulitiden

Nach der im Rahmen der Chapel Hill Consensus Conference festgelegten Klassifikation werden die primären systemischen Vaskulitiden wie folgt unterteilt:

<u>Vaskulitisform</u>	<u>betroffenes Gefäß</u>	<u>Krankheitsbild</u>
Vaskulitiden großer Gefäße	Aorta und Hauptäste	Riesenzellerarteriitis Takayasuarteriitis
Vaskulitiden mittlerer Gefäße	mittelgroße und kleine Arterien	Polyarteriitis nodosa Morbus Kawasaki
Vaskulitiden kleiner Gefäße	Arteriolen, Kapillaren und Venolen	Wegener'sche Granulomatose Mikroskopische Polyangiitis Churg-Strauss-Syndrom Henoch-Schönlein Purpura Essentielle Kryoglobulinämische Vaskulitis Kutane Leukozytoklastische Angiitis

Tabelle 1: Klassifikation der primären systemischen Vaskulitiden (3) (Auszug)

Unspezifische Allgemeinsymptome und sich ähnelnde Kardinalsymptome der einzelnen Krankheitsbilder bestimmen das klinische Bild der systemischen Vaskulitiden. Fieber, Gewichtsverlust, rheumatische Beschwerden (2), eine Nierenbeteiligung in Form einer chronisch-progredienten oder einer rapid-progressiven Glomerulonephritis, sowie eine Lungenbeteiligung, die, gekennzeichnet durch eine pulmonale Kapillaritis, unter Umständen fulminante Verlaufsformen annehmen kann, sind regelmäßig zu finden (3, 11, 5).

Als zugrunde liegender Pathomechanismus wird eine Störung der leukozytär - endothelialen Interaktion mit daraus folgendem Endothelschaden postuliert (12, 13).

Neben der Einteilung nach der Größe des hauptsächlich betroffenen Gefäßes werden ANCA-negative und ANCA-positive Vaskulitiden unterschieden (4). Letztere sind durch das Auftreten von Auto-Antikörpern gegen granulozytäre Oberflächenstrukturen (ANCA: „anti-neutrophil cytoplasmic antibodies“) gekennzeichnet.

Erstmals Anfang der 80er Jahre bei Patienten mit renaler Vaskulitis beschrieben, treten diese Auto-Antikörper (14, 15) bei verschiedenen Vaskulitiden kleiner Gefäße, wie der Wegener'schen Granulomatose (WG), der Mikroskopischen Polyangiitis (MPA) und des Churg-Strauss-Syndroms (CSS), regelmäßig auf. Der Begriff der ANCA-assoziierten systemischen Vaskulitiden (AASV) wurde eingeführt (16, 17).

2.2.2 Sekundäre systemische Vaskulitiden

Die sekundären systemischen Vaskulitiden treten als Begleiterscheinung im Rahmen verschiedener Erkrankungen auf. Hierzu gehören Allergien, Infektionen (z.B. Streptokokken-, Hepatitis B und C-, Borreliose-, HIV- Infektionen), Tumorerkrankungen sowie Autoimmunerkrankungen (systemischer Lupus erythematoses, Sjögren-Syndrom, M. Crohn u.a.) (18).

2.3 ANCA - assoziierte systemische Vaskulitiden

2.3.1 Wegener'sche Granulomatose

Die WG, von Friedrich Wegener 1939 als eigenständiges Krankheitsbild beschrieben (19), tritt mit einer Inzidenz von 9,5-16 Erkrankungen pro eine Million Einwohner im Jahr auf (20). In der Regel sind Patienten im Alter von 65-75 Jahren betroffen (21).

Sie ist durch eine nekrotisierende und granulomatöse Entzündung der kleinen und mittleren Gefäße gekennzeichnet, die typischerweise den oberen und unteren Atmungstrakt sowie die Nieren betreffen. Charakteristisch ist die Abwesenheit von intravasalen Immunkomplexablagerungen, auch als „pauci-immun“ (lat. pauci = wenige) bezeichnet, und die Granulombildung (3). Die Veränderungen können auf den Atmungstrakt beschränkt bleiben oder im Krankheitsverlauf generalisieren. Im Kopfbereich kann es neben einer eitrig-granulomatösen Sinusitis, Otitis oder Rhinitis zur Zerstörung des Nasenseptums mit Ausbildung einer sogenannten Sattelnase kommen (22).

Bei über 90% der Patienten findet sich im Krankheitsverlauf eine Lungenbeteiligung, bei 9% der Patienten ist die Lunge das einzig betroffene Organ. Subklinische Veränderungen kommen vor, aber auch fulminante Verlaufsformen mit massiven diffusen alveolären Hämorrhagien als Folge einer pulmonalen Kapillaritis treten auf (5).

Die Niere ist bei über 70% der Patienten in das Krankheitsgeschehen mit einbezogen. In vielen Fällen tritt eine rapid-progressive Glomerulonephritis (RPGN) auf, die zu irreversiblen Organversagen führen kann (23).

Ist sowohl die Lunge als auch die Niere betroffen, spricht man vom „pulmo-renalen Syndrom“. Es ist ein potentiell lebensbedrohliches Krankheitsbild, das auch im Rahmen anderer Vaskulitiden wie dem Goodpasture-Syndrom oder dem Lupus erythematodes auftritt. Es ist Ausdruck einer Kleingefäßvaskulitis, die mit einer RPGN und einer diffusen alveolären Hämorrhagie (DAH) einhergeht. Es kann zur Ausbildung des „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS) mit respiratorischer Insuffizienz und Beatmungspflicht kommen (24). Bei Patienten mit WG treten DAH mit einer Inzidenz von 7-45% auf und gehen mit einer Mortalitätsrate von 60% einher (5).

Neben dem Atmungstrakt und den Nieren können bei der WG auch andere Organe wie das Nervensystem, die Haut oder der Magen-Darmtrakt betroffen sein. Fast alle Patienten leiden unter grippeähnlichen Symptomen mit Muskel- und Gelenkschmerzen (25). Therapeutisch

wird im Initialstadium eine immunsuppressive Therapie mit einer Kombination von Prednisolon und Cyclophosphamiden verabreicht. Die Erhaltungstherapie besteht aus der Gabe von Azathioprin und Prednisolon, zusätzlich kann der Plasma-Austausch von Nutzen sein (5). So hat sich mit der Einführung der Chemotherapie die Mortalitätsrate von 80% innerhalb des ersten Jahres nach Diagnosestellung auf eine 10-Jahres-Überlebensrate von 45% (MPA) und 75% (WG) verändert (26).

2.3.3 Mikroskopische Polyangiitis

Auch bei der MPA findet sich eine nekrotisierende Entzündung der kleinen und mittleren Gefäße. Sie wurde im Rahmen der „Chapel Hill Consensus Conference“ als eigenständige Erkrankung charakterisiert. Ähnlich der Wegener'schen Granulomatose durch eine rapid-progressive Glomerulonephritis und eine hämorrhagische Kapillaritis der Lungengefäße geprägt, fehlen hier die granulomatösen Entzündungsherde. Therapeutisch werden Kortikosteroide und Cyclophosphamide eingesetzt. (3, 27).

2.3.2 Churg-Strauss-Syndrom

Das CSS wurde erstmals 1951 durch Jakob Churg und Lotte Strauss beschrieben (28). Es ist durch eine eosinophilenreiche, granulomatöse Entzündung des Respirationstraktes sowie eine nekrotisierende Vaskulitis der kleinen und mittleren Gefäße gekennzeichnet. In der Regel ist das Syndrom mit einer Bluteosinophilie und asthmatischen Beschwerden assoziiert. Anders als bei der WG und MPA verläuft eine eventuelle Nierenbeteiligung unter milden Symptomen ab. Häufig ist das Herz betroffen und es kann in Zusammenhang mit einer möglichen Perikarditis, Myokarditis oder Koronargefäßentzündung zu Todesfällen kommen (29, 21). Die Behandlung besteht in der Verabreichung von Kortikosteroiden, nicht routinemäßig eingesetzt werden Cyclophosphamide (21).

2.4 Systemische Vaskulitiden beim Tier

Auch beim Tier werden Vaskulitiden beschrieben. Zugrunde liegend ist hier ebenso wie beim Mensch, eine Schädigung des Endothels mit lokaler Entzündungsreaktion, Neutrophilenakkumulation und Komplement-Aktivierung. Die Freisetzung neutrophiler mikrobizider Metaboliten führt zu vaskulärer Nekrosenbildung, Thrombosen und Hämorrhagien. Ursachen können infektiöse oder parasitäre Agentien, Endotoxine und Immunkomplex-Ablagerungen sein, ebenso können Vaskulitiden unbekannter Genese vorkommen. In der Regel sind die kleinen Blutgefäße betroffen, nur die Polyarteriitis nodosa ist eine Ausnahme. Die Einteilung der Vaskulitiden orientiert sich deshalb an den infiltrierenden Entzündungszellen. Es werden neutrophile, lymphozytäre, eosinophile und granulomatöse Vaskulitiden unterschieden (30).

Die steril-eitrige Meningitis-Arteriitis („steroid responsive meningitis-arteritis“ = SRMA) des Hundes ist durch eine eitrige Meningitis und nekrotisierende Vaskulitis im Bereich der spinalen Meningen mit einer hochgradigen Invasion von Entzündungszellen und dem Nachweis von ANCA im Serum und Liquor cerebrospinalis gekennzeichnet. In einigen Fällen betreffen die Gefäßveränderungen auch Koronar- und Mediastinalarterien. Bestimmte Rassen, z.B. der Berner Sennenhund, Beagle und Boxer zeigen eine Prädisposition für die Entwicklung der SRMA. Die Behandlung besteht in der Verabreichung von Immunsuppressiva (31).

Die Krankheits Symptome sind dem klinischen Bild des Kawasaki-Syndroms und der WG des Menschen ähnlich. Die SRMA gilt aufgrund der deutlichen histologischen und pathologischen Übereinstimmungen als anerkanntes Tiermodell für humane Vaskulitiden unbekannter Genese (32).

Die Polyarteriitis nodosa ist bei Hund, Katze und Schwein beschrieben. Hier zeigt sich eine systemische nekrotisierende Vaskulitis mit Immunkomplexablagerungen. Vor allem mittlere oder kleine Gefäße sind betroffen. Vaskuläre Nekrosen, Degeneration und Intimaproliferation bestimmen das histologische Bild. Herz- und Nierenversagen können auftreten. Auch hier besteht die Behandlung in der Verabreichung von Kortikosteroiden und gegebenenfalls Cyclophosphamiden (33, 34).

Mit der Ablagerung von Immunkomplexen und der Bildung von Antikörpern gegen nicht organspezifische nukleäre und zytoplasmatische Antigene geht der systemische Lupus

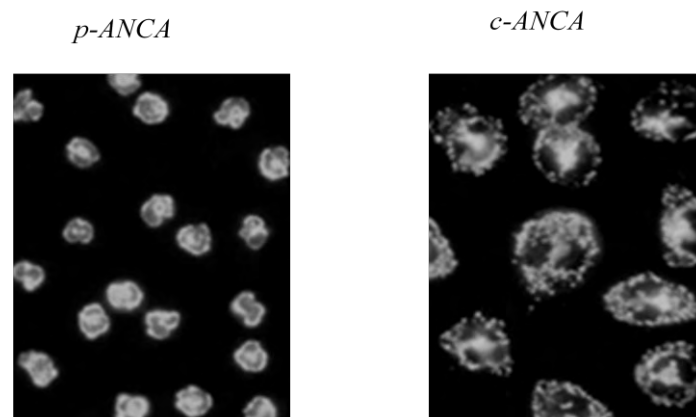
erythematodes einher. Beim Hund ist eine genetische Prädisposition in bestimmten Schäferhundlinien beschrieben (35, 36).

In Zusammenhang mit der Coronavirus-Infektion der Katze und der feline infektiösen Peritonitis (FIP) kommt es sekundär zu einer systemischen Vaskulitis. Deutliche Ergüsse in Thorax oder Abdomen sowie granulomatöse Entzündungen in unterschiedlichen Organen (ZNS, Auge, Niere) bestimmen hier das klinische Bild (37).

2.5 ANCA (“anti-neutrophil-cytoplasmic-antibodies”)

Bei den ANCA-assoziierten systemischen Vaskulitiden wie der Wegener'schen Granulomatose, der Mikroskopischen Polyangiitis oder dem Churg-Strauss-Syndrom treten regelmäßig Auto-Antikörper auf, deren Zielantigene Enzyme neutrophiler Granulozyten sind (38). Im Rahmen der Diagnostik der AASV wird eine Kombination aus indirektem Immunfluoreszenz-Test (IIF) und einem antigenspezifischen ELISA eingesetzt (39, 40). Mittels IIF lassen sich p-ANCA und c-ANCA unterscheiden.

p-ANCA (perinukleäre ANCA) erzeugen in Ethanol- und Formalinfixierten PMN ein perinukleäres Fluoreszenzmuster mit deutlicher Färbung um den Zellkern, c-ANCA (zytoplasmatische oder classic ANCA) zeigen ein zytoplasmatisches Fluoreszenzmuster mit fein-granulärer Anfärbung des Zytosols (41). Eine weitere Gruppe stellen die Antikörper gegen „minor target antigens“ dar. Sie zeigen eine diffuse, atypische Anfärbbarkeit des Zytosols und sind bisher keinem definierten Antigen oder Krankheitsbild zugeordnet (42).



Unterschiedliches Färbemuster von p-ANCA (perinukleäre Färbung) und c-ANCA (zytoplasmatische Färbung)

Abbildung 1:

(www.euroimmun.de)

Hauptantigen der p-ANCA ist die neutrophile Myeloperoxidase (MPO), eine Metalloproteinase, die man sowohl in azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten als auch in den Lysosomen von Monozyten findet. Aber auch andere neutrophile Granulakomponenten wie Elastase, Cathepsin G, Lactoferrin und Lysozym stellen Zielantigene für p-ANCA dar. Bei Erkrankungen wie der MPA und dem CSS lassen sich bei ca. 70% bzw. 50% der Patienten p-ANCA nachweisen. Auch bei einigen sekundären Vaskulitiden zeigt sich ein positiver p-ANCA Titer (41, 16, 43).

Bei Patienten mit WG gehören 80-95% der ANCA zur Gruppe der c-ANCA (41). Die c-ANCA weisen eine hohe Spezifität (97%) und Sensitivität (93%) für diese Erkrankung auf. Hauptantigen der c-ANCA ist die neutrophile Proteinase 3 (PR3) (6). Die PR3 ist eine Serinprotease, die wie die MPO in den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten und in den Lysosomen der Monozyten lokalisiert ist, aber auch auf der Zellmembran von ruhenden neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (mPR3).

Ein Anstieg des ANCA-Titers ist in den meisten Fällen mit einer Verschlechterung des Krankheitsbildes assoziiert (6, 7). Ein Monitoring des ANCA-Titers hat somit auch in der Therapieüberwachung seine Bedeutung (6, 44). Im Widerspruch dazu stehen Untersuchungen, die einen vom Krankheitsverlauf unabhängigen ANCA-Titer feststellten (45).

Auto-Antikörper werden von B-Lymphozyten und Plasmazellen gebildet. Bei Patienten mit WG korreliert eine erhöhte B-Zell-Aktivität mit einer erhöhten Krankheitsaktivität (46). Mit dem Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen B-Lymphozyten wurde im Rahmen einer Studie innerhalb weniger Monate die klinische Remission erreicht (47).

Da ANCA größtenteils IgG „class-switched“ Antikörper sind, ist die Rolle der T-Zellen in diesem Zusammenhang von Interesse. T-Zellen zeigen im Rahmen der WG einen vom Krankheitsgeschehen unabhängigen erhöhten Aktivierungszustand (46), meist mit einem TH1 CD⁴⁺ Zytokinmuster (48). Autoreaktive T-Zellen gegen PR3 und MPO Antigene wurden beschrieben (49, 50).

In Zusammenhang mit einer nasalen *Staphylococcus aureus* Infektion auftretende Exotoxine, sogenannte „Superantigene“, stellen mögliche Antigene dar, die zu einer Aktivierung von T-Zellen mit nachfolgender Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und verstärkter (Auto-) Antikörper-Produktion führen (51, 52).

Ein alternativer Mechanismus der PR3-ANCA Produktion mag über eine Expression von cPR3 (complementary PR3) gehen. Diese Expression geht mit der Bildung von Anti-Idiotyp Antikörpern einher, die eine Kreuzreaktion mit PR3 zeigen (53).

2.6 Endotheliale Barriere: Funktion und Regulation

Das Endothel kleidet als einlagige Zellschicht die luminale Oberfläche des gesamten Gefäßsystems aus. Es bildet eine semipermeable Barriere zwischen Gefäßlumen und darunter liegendem Gewebe. Heute ist klar, dass das Endothel keine passive Grenzschrift darstellt, sondern wichtige Funktionen wie die Regulation der leukozytären Adhäsion und -Migration, die Beeinflussung der Blutgerinnung (54), sowie die Kontrolle des Austauschs von Flüssigkeiten und Makromolekülen zwischen Blut und Interstitium wahrnimmt (55). Das Endothel spielt eine entscheidende Rolle im pathophysiologischen Entstehungsprozess von Entzündungen, Atherosklerose, Thrombose, Herz- und Nierenversagen sowie Organtransplantatabstoßungen (56).

2.6.1 Endotheliale Heterogenität

Die endotheliale Auskleidung der Gefäße unterscheidet sich in Bezug auf die Morphologie, Mediatorensekretion, Antigenpräsentation oder Stressantwort.

Aufgrund der verschiedenen interzellulären Verbindungen können kontinuierliches, fenestriertes oder diskontinuierliches Endothel unterschieden werden. In kontinuierlichen Kapillaren fusionieren die luminale und abluminale Membran nur im Bereich der „tight junctions“. Die Endothelzellen bilden hier eine sehr restriktive Barriere. In der Mikrozirkulation des Gehirns oder der Lunge findet sich eine solche Gefäßauskleidung. Fenestrierte Kapillaren haben Poren von 50-60 nm Durchmesser und sind z.B. im Magen-Darm-Trakt oder den Nierenglomeruli lokalisiert. Diskontinuierliches Endothel bildet inter- und intrazelluläre Poren von 0,1-1µm Durchmesser, die Basalmembran ist in die Poren miteinbezogen oder nicht vorhanden. In der Leber z.B. findet so ein Austausch von Makromolekülen und Blutzellen statt (57).

Auch die endotheliale Oberflächenantigenexpression unterscheidet sich deutlich in den verschiedenen Organen und Gefäßabschnitten (58).

So wird der von Willebrand Faktor (vWf), allgemein als Endothelzellmarker verwendet, in den einzelnen Gefäßabschnitten in sehr unterschiedlichen Mengen exprimiert (54). Endothel in Arterien und Venen zeigt spezifische molekulare Marker. Gene, die vorwiegend in Arterien exprimiert werden, sind ephrinB2 oder EPAS1, venenspezifische Gene sind EphB4 oder NRP2. Die Endothelzellen sind in Arterien in Flussrichtung angeordnet, in Venen dagegen nicht (59). Die Interaktion von Leukozyten und Endothel findet vorwiegend in den Venolen

und nur bei schweren Endothelschäden in den Arteriolen statt. Eine Ausnahme bildet die Mikrozirkulation der Lunge, hier kommt die transiente oder feste Bindung der Leukozyten auch in Arteriolen vor. Die meisten Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, E-Selektin, P-Selektin) werden vorwiegend auf venösem Endothel exprimiert (57).

2.6.2 Endothelialer Transport

Der Übertritt von Makromolekülen, Leukozyten, Wasser und gelösten Substanzen über das Gefäßendothel ist komplex reguliert und findet über zwei Hauptwege, transzellulär und parazellulär, statt (60). In kontinuierlichem Endothel, wie es in der Lunge zu finden ist, passieren gelöste Substanzen, wie Wassermoleküle, Glukose oder Urea, bis zu einem Radius von 3 nm die endotheliale Barriere passiv auf parazellulärem Weg, d.h. über interendotheliale Spalträume. Die Durchlässigkeit der Spalträume ist durch die Eigenschaften der interendothelialen Verbindungen, den „tight junctions“ und „adherens junctions“, bestimmt. Moleküle mit einem Radius $> 3\text{nm}$ überwinden das ruhende Endothel transzellulär über aktive Transportmechanismen, z.B. vermittelt der gp60-Rezeptor den transendothelialen Albumintransport (55).

2.6.3 Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmoleküle können in drei Gruppen unterteilt werden. Selektine werden nach dem Zelltyp, auf dem sie ursprünglich beschrieben wurden, benannt: L-Selektin (Lymphozyten), P-Selektin (Plättchen/Endothel) und E-Selektin (Endothel). Sie vermitteln die transiente Bindung von Leukozyten an Endothelzellen.

Integrine werden auf hämatopoetischen Zellen (β_2 -Integrine) und Endothelzellen oder Thrombozyten (β_1 -Integrine) exprimiert. Sie sind aus zwei Untereinheiten (α und β) zusammengesetzt, die je nach Kombination einen Rezeptor mit unterschiedlicher Funktion bilden. Integrine „integrieren“, d.h. sie leiten Signale aus dem Extrazellulärraum an das Zytoskelett weiter. Sie binden neben den Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin Superfamilie (IGSF) eine Reihe von extrazellulären Matrix-Proteinen (Fibronectin, Vitronectin, Laminin, Faktor X). Integrine werden deskriptiv als LFA-1 („lymphocyte function-associated antigen-1“), Mac-1 bezeichnet oder nach Kombination der Untereinheiten $\alpha_L\beta_2$ bzw. CD11a/CD18 („cluster of differentiation“) benannt (61).

Zur Immunglobulin Superfamilie (IGSF) gehören die „cellular adhesion molecules“ (CAMs) ICAM-1, ICAM-2, („intercellular-adhesion molecule“) VECAM-1 („vascular cell adhesion

molecule“) und PECAM-1 („platelet-endothelial cell adhesion molecule“) (62). ICAM-1 ist ein transmembranöses Glykoprotein, seine fünf extrazellulären Immunoglobulin-ähnlichen Domänen sind für die Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktion verantwortlich.

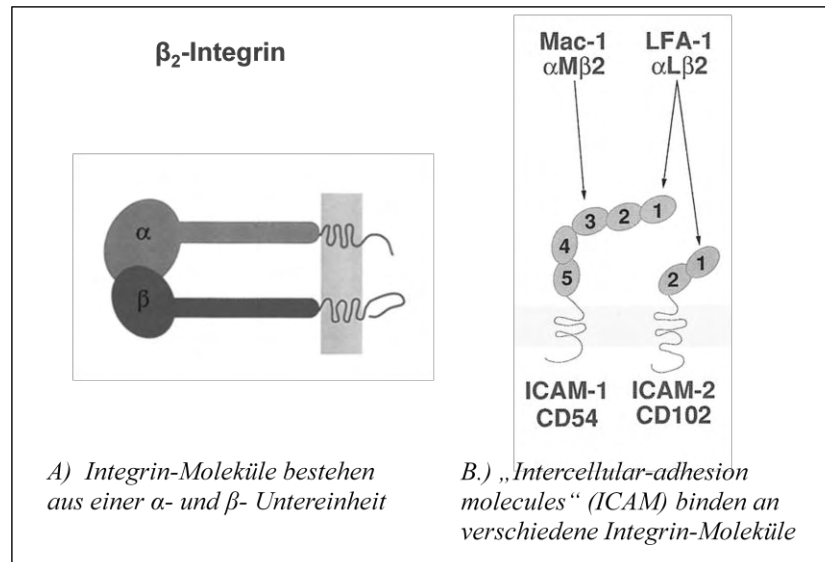


Abbildung 2:

(modif. nach 63)

ICAM-1 bindet u.a. an die β_2 -Integrine LFA-1 und Mac-1 und vermittelt so die feste Bindung und Transmigration von Leukozyten. Bei der Aktivierung von T-Zellen fungiert ICAM-1 als Co-Aktivator. Auf verschiedenen Zelltypen wie Fibroblasten, Leukozyten, Keratinozyten und Endothelzellen wird ICAM-1 konstitutiv exprimiert. Es spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von entzündlichen Erkrankungen wie Asthma, „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS), Ischämie/Reperfusions-Schäden und Autoimmunerkrankungen. Pro-inflammatorische Mediatoren ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$), Virusinfektionen oder ROS (H_2O_2) induzieren eine vermehrte zelluläre Expression bzw. eine Steigerung der Affinität von ICAM-1. Dies kann durch eine Konformationsänderung oder Umverteilung der konstitutiv exprimierten Moleküle sowie eine Verstärkung der Transkriptionsrate erreicht werden (64).

2.6.4 Zytoskelett

Das Zytoskelett wird durch drei Arten von Filamenten gebildet. Mikrotubuli (25 nm Durchmesser) bestehen aus dem Protein Tubulin und bestimmen die Position von intrazellulären Organellen und sind mit dem Centrosom verbunden. Intermediär-Filamente (10 nm) werden durch eine heterogene Gruppe von Intermediärfilamenten gebildet und geben der Zelle mechanische Stabilität. Aktin-Filamente (5-9 nm) sind zweisträngige Polymere des

Proteins Aktin. Sie sind in zwei dreidimensionalen Strukturen angeordnet und bestimmen die äußere Zellform sowie die Bewegung der gesamten Zelle (65).

„Tight-junctions“ und „adherens-junctions“ bilden die Hauptkomponenten der Zell-Zell-Verbindungen in endothelialen Zellmonolayern (66). Sie sind mit dem Zytoskelett verbunden und sichern sowohl die mechanische Stabilität der Zelle als auch die Barrierenwirkung des Zellverbandes.

„Adherens-junctions“ werden durch die transmembranösen VE-Cadherine gebildet. Diese verbinden über die Ankerproteine α - β - und γ -Catenin, Vinculin oder α -Aktinin die Aktin-Filamente benachbarter Zellen miteinander.

„Tight-junctions“ bestehen aus den transmembranösen Proteinen Occludin und Claudin, die über Proteine der ZO-Familie ZO-1/2/3 mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind (65, 67). Proteine der Integrin-Familie verbinden die extrazelluläre Matrix (Kollagen, Fibronectin, Laminin) über Proteine wie Talin, Vinculin oder Paxillin mit dem zellulären Zytoskelett.

Aktin-Filamente bilden das sogenannte Kortikal-Band, das in ruhenden Endothelzellen deutlich ausgeprägt ist und die Zusammensetzung und Lokalisation der Zell-Zell und Zell-Matrix-Verbindungen stabilisiert. Eine Ruptur des Kortikal-Bandes geht mit einer endothelialen Barrierenstörung einher (68).

Über die Funktion von Intermediär-Filamenten und Mikrotubuli in Zusammenhang mit der Regulation der endothelialen Integrität ist bisher wenig bekannt (67). Sowohl die Bestandteile des Zytoskeletts als auch die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen sind dynamische Strukturen, die sich über Ab-, Auf- und Umbauvorgänge den jeweiligen Anforderungen anpassen können (65, 67).

2.6.5 Modifikation der endothelialen Integrität

Mechanismen

Eine Beeinträchtigung der endothelialen Integrität ist durch eine Störung der Barriere- und der Transportfunktion gekennzeichnet. Diese äußert sich vor allem in einer Erhöhung der parazellulären Transportrate durch Öffnung interendothelialer Spalten (69). Allerdings ist auch ein vermehrter transzellulärer Transport von Albumin in Zusammenhang mit einem PMN vermittelten Anstieg der Permeabilität beschrieben worden (70).

Eine Anspannung des kontraktiven Apparates der Endothelzellen (aktive Kontraktion) und der Zerfall von Zell-Zell-Verbindungen und Zell-Matrix-Adhäsionsmolekülen (passive Retraktion) führen zu Zellabrundung und interendothelialer Spaltenbildung. Das „tensegrity-

model“ beschreibt dies als Prozess entgegengesetzt wirkender Kräfte, welche einerseits zentripetal wirkend eine Kontraktion der Endothelzelle auslösen, andererseits die Endothelzelle in einem flachen Zustand halten und somit die äußere Zellform und Adhärenz regulieren. Je nach Überwiegen der einen oder der anderen Kräfte kommt es zu einem Anstieg oder Abfall der endothelialen Permeabilität (71, 72).

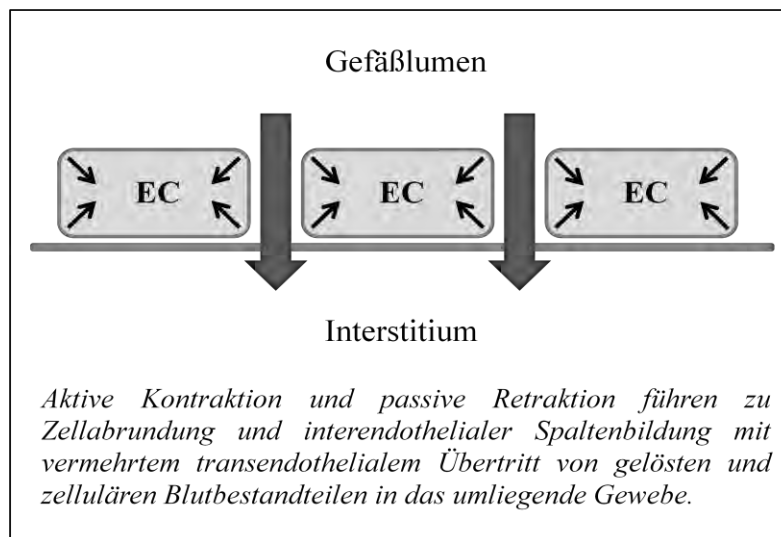


Abbildung 3:

Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) dienen als Signalmoleküle und haben Einfluss auf zahlreiche zelluläre Funktionen von der Zytokin-Freisetzung bis hin zur Zellproliferation. In höheren Konzentrationen können sie über die oxidative Modifikation von Proteinen und Carbohydraten, die Lipidoxidation und DNS-Veränderungen Schäden in der Zelle verursachen. Das Ausmaß der Schädigung ist von der ROS Konzentrationen, sowie den antioxidativen Mechanismen der lokalen Umgebung und der Zielzelle abhängig. Aktivierte und adhären Leukozyten, aber auch die Endothelzelle selbst sind Quellen von ROS. Oxidativer Stress erhöht die endotheliale Permeabilität und steigert die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten.

Die Regulation der endothelialen Barrierenfunktion ist von der hochdynamischen Struktur des Aktin-Netzwerkes abhängig. Ein Anstieg der endothelialen Permeabilität zeigt sich in einer interendothelialen Spaltenbildung, der endothelialen Kontraktion, einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, einer erhöhten Stressfaserbildung und der Reduktion des Kortikal-Bandes (68).

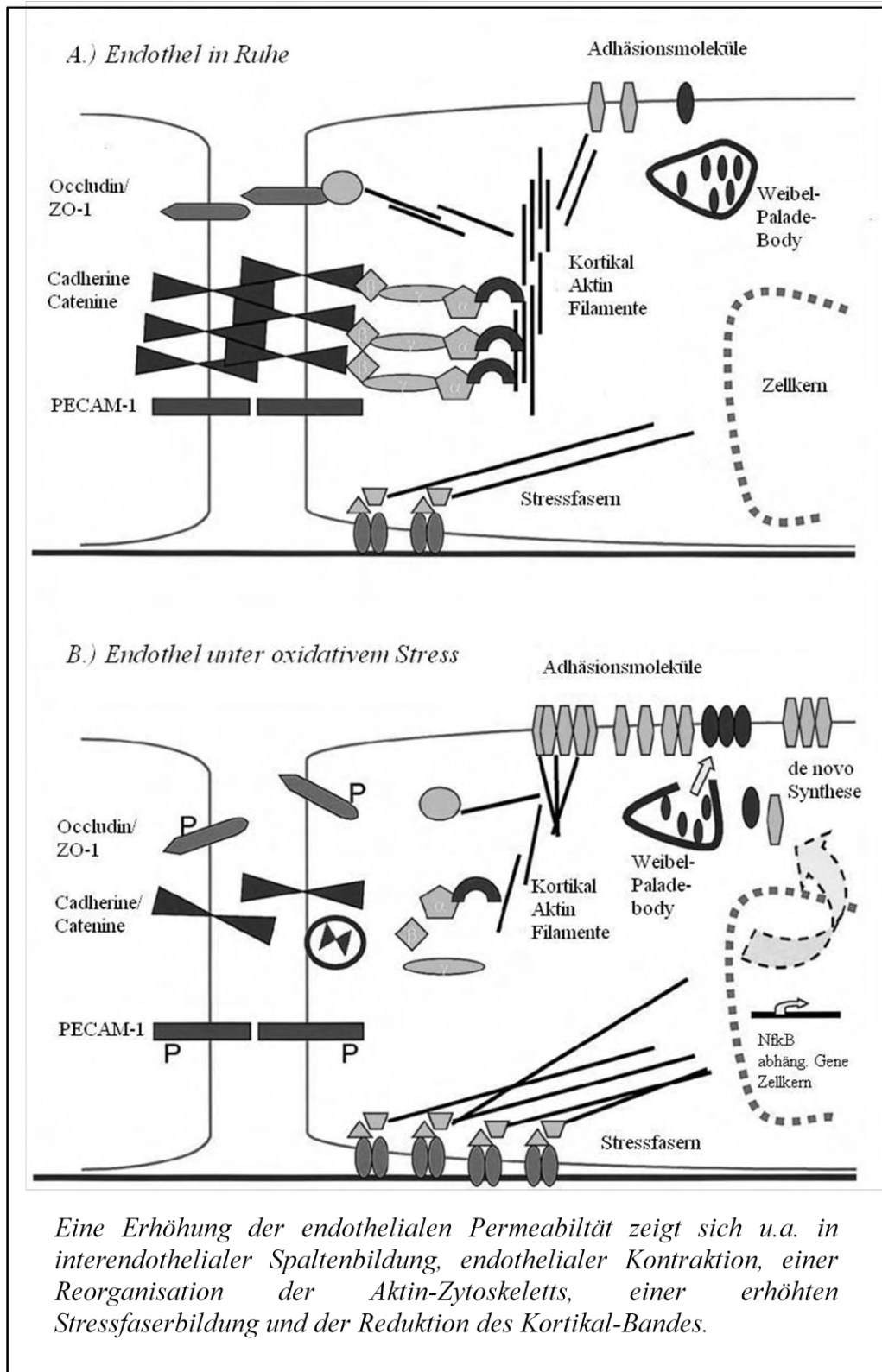


Abbildung 4:

modif. nach (68)

Nach einer Aktivierung durch ROS kommt es zu einer vermehrten endothelialen Expression von Adhäsionsmolekülen, wobei P-Selektin aus den „Weibel-Palade bodies“ freigesetzt wird,

die Neusynthese von ICAM-1 und VCAM-1 wird über eine Aktivierung des „nuclear-factor κ B“ induziert. Die Dissoziation und Umverteilung der Proteine der „tight- und adherens junctions“ führt zur Destabilisierung der Zell-Zell-Verbindungen mit nachfolgender interendothelialer Spaltenbildung. Oxidativer Stress verursacht eine Reduktion des Kortikal-Bandes, die gesteigerte Bildung von Stressfasern und die Kontraktion der Endothelzelle. Letztere werden durch die Interaktion Aktin-Myosin ausgelöst, hierbei ist die Phosphorylierung der MLC („myosin-light-chain“) ein Schlüsselereignis. H_2O_2 kann einen Anstieg der Phosphorylierung der MLC bewirken (73). Permeabilitätssteigernde Agonisten, wie Thrombin oder Histamin, bewirken über eine Aktivierung der Calcium²⁺/Calmodulin abhängige MLC-Kinase eine Phosphorylierung der MLC.

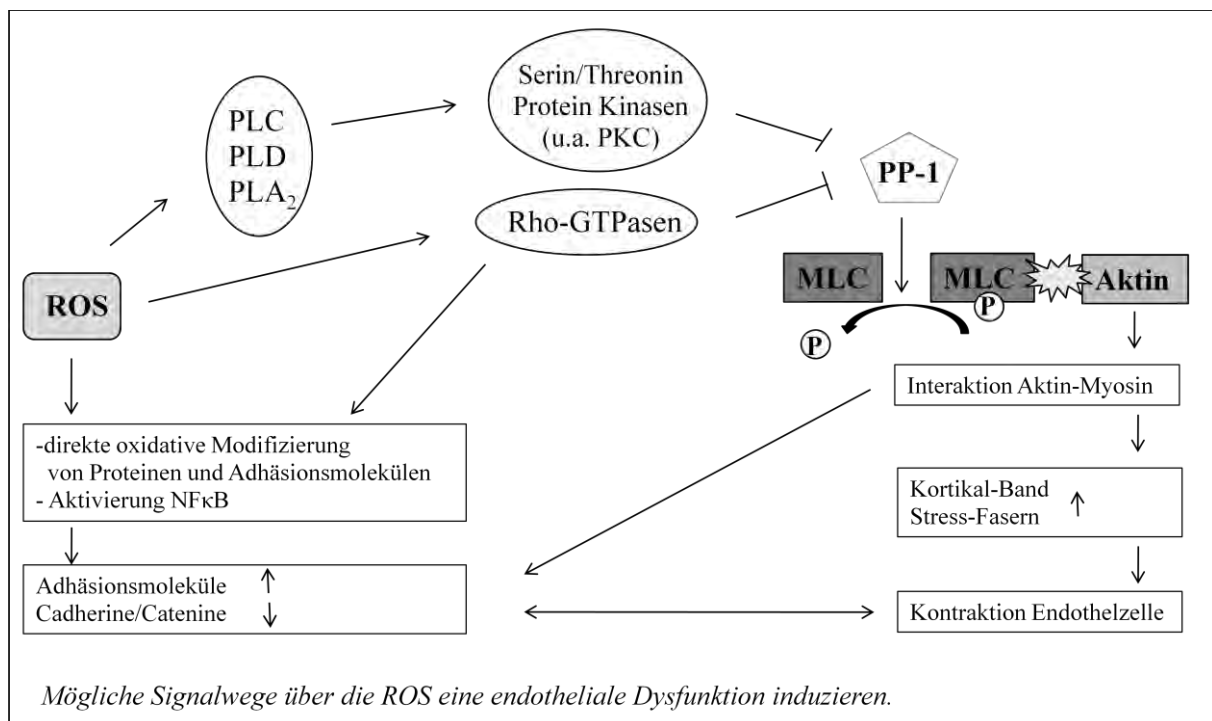


Abbildung 5:

(modif. nach 68)

Die Protein-Kinase-C (PKC) gehört zur Familie der Serin/Threonin-Protein-Kinasen, sie kann die Aktivität der für die Myosin Dephosphorylierung verantwortlichen Phosphatase-1 (PP1) hemmen (74, 68). ROS stimulieren die PKC über die Aktivierung von PLC (Phospholipase-C), PLD (Phospholipase-D), PLA₂ (Phospholipase A₂). In Thrombin stimulierten Endothelzellen führt eine Aktivierung der PKC zu einer Dissoziation der Proteine VE-Cadherin und α + β -Catenine. Die „upstream“ Regulatoren der MAP-Kinase („mitogen-activated protein kinase“) können direkt von ROS aktiviert werden. Die p38-MAP-Kinase ist an der Umstrukturierung der Aktinfilamente beteiligt.

Die Familie der Rho-GTPasen besteht aus mehreren Mitgliedern, wobei Cdc42, RhoA und Rac am besten charakterisiert sind (68). Sie sind von entscheidender Bedeutung bei der Regulation des kontraktiles Apparates der Endothelzelle (67). Der „downstream“ Effektor, die Rho-Kinase, führt über eine Phosphorylierung der MLC-Phosphatase PP1 zu einer vermehrten Phosphorylierung der MLC. Es ist davon auszugehen, dass auch Rho-GTPasen in den durch ROS induzierten Umbau des endothelialen Zytoskeletts miteinbezogen sind (68).

Das Lungenödem, ein Krankheitsbild mit gestörter endothelialer Integrität

Das Endothel der menschlichen Lunge hat eine Oberfläche von ca. 130 m² (75). Es bildet eine Barriere, die den Übertritt von Plasmaproteinen weitgehend beschränkt (55). Normalerweise gleichen sich Flüssigkeitsverlust aus dem Gefäßsystem und Absorptionsrate im Zirkulationssystem der Lunge aus. Bei einer Störung des Gleichgewichts kommt es zur Ausbildung eines Lungenödems mit Ansammlung von Flüssigkeit und Plasmaproteinen im Interstitium bzw. im Alveolarraum. Hydrostatischer Druckanstieg durch Linksherzversagen, neuronale pulmonale Vasokonstriktion oder primärer Lungenhochdruck resultieren in einem Anstieg der filtrierten Flüssigkeitsmenge, ebenso führt ein Absinken des kolloidosmotischen Drucks zu verstärkter Filtration von Flüssigkeit und gelösten Substanzen (56).

Auch eine primäre Störung der endothelialen Schrankenfunktion führt zu deutlichen Verlusten von Makromolekülen und Flüssigkeiten in den Interstitialraum. Bei einem interstitiellen Druckanstieg über 40 mmHg kann es zu einer Ruptur der epithelialen Barriere kommen und zur Überflutung der Alveolen mit proteinreichem Exsudat.

Diesem pathophysiologischen Mechanismus entspricht das klinische Bild des Lungenversagens ALI („acute lung injury“) / ARDS mit akuter Atemnot und schwerer Sauerstoffunterversorgung. Es ist durch die Aktivierung intrapulmonaler und zirkulierender Zellen, sowie einen deutlichen Anstieg der pulmonalen Konzentration neutrophiler Granulozyten und der Zytokinproduktion gekennzeichnet. Hierbei spielt das pulmonale Endothel eine Schlüsselrolle. Durch eine Änderung seines Aktivitätszustandes hat das Endothel entscheidenden Einfluss auf die pulmonale und systemische Hämostase, es reguliert die Interaktion mit den neutrophilen Granulozyten und fördert über eine Änderung der Permeabilität die Ödembildung. Das ARDS geht mit einer hohen Mortalitätsrate einher (75).

Besonderheiten des pulmonalen Endothels

Eine Reihe von Proteinen (Aminopeptidase-P oder OX-45) wird ausschließlich auf Lungenendothel exprimiert (76). Auch pulmonales mikro- und makrovaskuläres Endothel unterscheiden sich hinsichtlich Struktur und Funktionalität (77). So ist in der Rattenlunge ALCAM /CD 166 ausschließlich auf Kapillarendothel und nicht in größeren Pulmonalgefäßen zu finden (78). In der humanen Lunge finden sich im Vergleich zu anderen Organen vermehrt ICAM-1 oder P-Selektin auf der Endotheloberfläche. Eventuell damit in Zusammenhang stehend ist der große Pool von Leukozyten in der pulmonalen Mikrozirkulation (79). Hier sind die Gefäße auch weniger durchlässig für Proteine und Flüssigkeiten als die großen Gefäße der Lunge (80). Insgesamt zeichnet sich das Endothel in der Lunge durch einen pro-inflammatorischen Phänotyp aus, der im Sinne einer schnell verfügbaren Abwehr gesehen werden kann (79).

Hinweise auf eine gestörte Endothelfunktion in der Vaskulitis

Das Gefäßendothel ist das letztendlich betroffene Organ in der Vaskulitis (81). Histopathologische Untersuchungen zeigen, dass die luminalen Endothelzellen in entzündeten Gefäßen angeschwollen sind, zudem erscheint die Färbung für verschiedene Endothelzellmarker vermindert und verändert (82).

Noch bevor später die typischen histopathologischen Veränderungen mit perivaskulärer Nekrose und Granulozyteninfiltration bei der WG auftreten, ist die Ablösung von EC von der Basalmembran und eine erhöhte Zellzahl zirkulierender EC zu finden (83). Auch bei Patienten mit aktiver WG konnte eine erhöhte Anzahl zirkulierender EC beobachtet werden, wobei einige der EC apoptotische Marker zeigten, die meisten waren von nekrotischem und pro-thrombotischen Phänotyp (84, 85). Eine verstärkte Expression des von-Willebrand-Faktors (vWF) als Ausdruck akuter endothelialer Aktivierung ließ sich auf EC nachweisen, die mit ANCA aktivierten Granulozyten inkubiert wurden, und bei Patienten mit WG wurden erhöhte vWF Plasma-Konzentrationen festgestellt (86).

In einem Rattenmodell induzieren ANCA endotheliale Schädigungen in Mesenterial- und Lungenkapillaren, lokale Blutungen kennzeichnen diesem Bereich (87). Bei Patienten mit systemischer Vaskulitis konnte eine weitreichende Beeinträchtigung der Endothelfunktion, bestimmt u.a. durch die endothelabhängige Relaxierung mikro- und makrovaskulärer Gefäße, festgestellt werden. Eine Verbesserung der Endothelfunktion zeigte sich während erfolgreicher Therapie (88, 89).

2.7 Die Rolle neutrophiler Granulozyten in der Vaskulitis

Neutrophile Granulozyten sind ein wichtiger Bestandteil des unspezifischen Immunsystems und ihre primäre Funktion ist die Abwehr pathogener Mikroorganismen. Chemotaxis, Phagozytose oder die Freisetzung zytotoxischer Reaktionsprodukte sind Mechanismen, die der Mikrobenabwehr dienen, dennoch können dieselben Mechanismen bei einer inadäquaten Granulozytenaktivierung zu einer deutlichen Schädigung des Gewebes führen (90). Im Rahmen einer Entzündung freigesetzte Chemokine, wie Interleukin (IL) -8, Plättchen-aktivierender Faktor (PAF), Komplementfaktor 5a (C5a) oder Leukotrien B₄ (LTB₄), bewirken eine gerichtete Bewegung der Granulozyten in Richtung ansteigender Konzentration der Mediatoren (63).

2.7.1 Die leukozytär-endotheliale Adhäsionskaskade

Die Interaktion von neutrophilen Granulozyten und Endothel findet in der Regel in bestimmten Abschnitten des Gefäßsystems statt. Sie kann in verschiedene Phasen eingeteilt werden, wobei jede mit spezifischen Adhäsionsmolekülen und Aktivatoren bzw. Chemokinen assoziiert ist.

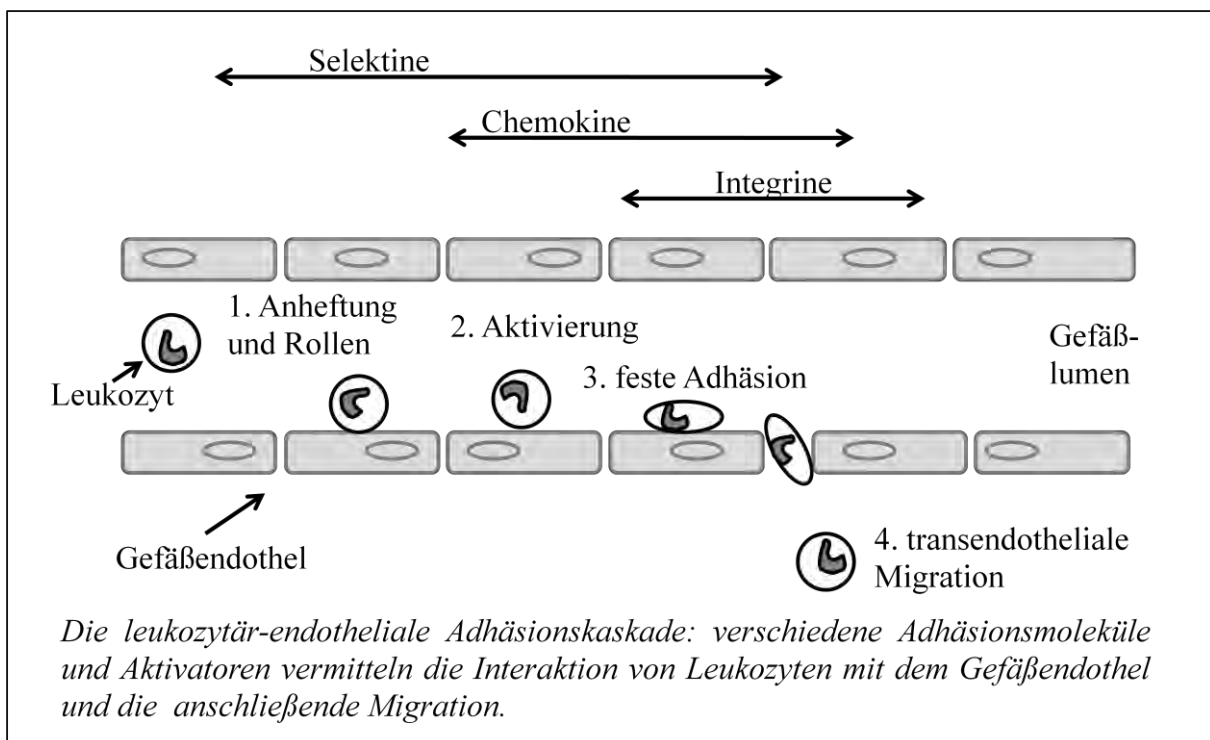


Abbildung 6:

(modif. nach 63)

Leukozyten können mit aktivierten Endothelzellen in Kontakt treten, indem sie zuerst Selektin-abhängig auf den Endothelzellen rollen, dann Chemokin-vermittelt ihre Integrin-Moleküle aktivieren, über diese fest an das Endothel adhären und sich dabei abflachen. Die Leukozyten transmigrieren schließlich durch das Endothel und wandern in das entzündete Gewebe ein (63).

Pro-inflammatorische Zytokine aktivieren PMN und Endothelzellen und induzieren die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen. Nach der Verlangsamung und Margination der zirkulierenden PMN kommt es zum „rolling“, der Selektin-vermittelten transienten Bindung der Granulozyten an das Endothel. L-Selektin wird konstitutiv auf PMN exprimiert. P-Selektin wird in der Endothelzelle in „Weibel-Palade bodies“ gespeichert und kann innerhalb von Minuten nach Stimulation auf die Membranoberfläche transloziert werden. Sein neutrophiler Ligand ist PSGL-1 („P-selectin glykoprotein ligand-1“). E-Selektin dagegen wird in der Endothelzelle neu synthetisiert und erscheint 1-2h nach der Stimulation an der Membran-Oberfläche. E-Selektin interagiert mit PSGL-1 und ESL-1 („E-selectin-ligand 1“) (91).

Für die feste Adhäsion der Granulozyten am Endothel ist die Aktivierung der granulozytären β_2 -Integrin-Familie (CD11/CD18) Voraussetzung, diese binden an „intercellular adhesion molecules“ auf der Endothel-Oberfläche. CD11a/CD18 (LFA-1) und CD11b/CD18 (Mac-1) bestehen je aus einer α - und β -Untereinheit. Im ruhenden Granulozyten liegen die β_2 -Integrine in inaktiver Form vor, die Ligation von monoklonalen Antikörpern oder die Interaktion mit stimulierenden Molekülen auf den Endotheloberfläche führt zu einer Konformationsänderung und Aktivierung (62).

„Intercellular adhesion molecules“ (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM-1) gehören zur Immunglobulin Superfamilie, sie enthalten ein oder mehrere Immunglobulin (Ig) ähnliche Domänen, die charakteristisch für Antikörper sind (65). Die endotheliale ICAM-1 Expression kann durch pro-inflammatorische Mediatoren (TNF, IL-1 Endotoxine) verstärkt werden. CD11b bindet neben ICAM-1 und 2 auch an weitere Liganden. Die transendotheliale Migration von Granulozyten folgt nicht notwendigerweise auf die feste Adhäsion. In der Regel ist dafür ein chemotaktischer Gradient Voraussetzung. Typische Chemokine sind (fMLP = n-formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin, C5a oder LTB₄) (62).

2.7.2 Antimikrobielle Mechanismen

Im extravaskulären Bindegewebe bewegen sich die Granulozyten chemotaktisch hin zum Entzündungsherd (63). Zeitgleich mit der möglichen Phagozytose, d.h. der Aufnahme von opsonierten Mikroorganismen ins Zellinnere, werden zwei antimikrobielle Mechanismen aktiviert: der „oxidative oder respiratory burst“, ein sauerstoffabhängiger Prozess, bei dem reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder reaktive Stickstoffspezies (RNS) entstehen, sowie ein enzymatischer Prozess, die Degranulierung, in dessen Folge der Inhalt neutrophiler Granula in das Phagolysosom abgegeben wird. Daraufhin kommt es zur Lyse des aufgenommenen Partikels. Eine Schädigung des umliegenden Gewebes tritt auf, wenn antimikrobielle Produkte in den Extrazellulärraum abgegeben werden und/oder eine Beendigung der neutrophilen Aktivierung nicht stattfindet (92).

Degranulierung

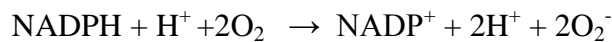
Analog zur Differenzierung des neutrophilen Granulozyten bilden sich die intrazellulären Granula aus (91). Nach der Abfolge ihres Auftretens unterscheidet man drei Arten. Die primären oder azurophilen Granula treten im Promyelozytenstadium auf und enthalten überwiegend Myeloperoxidasen, Serinproteasen (Elastase, Cathepsin G, Proteinase 3) und antibiotisch wirksame Proteine. PR3 besitzt proteolytischen Eigenschaften und spaltet u.a. Elastin, Fibronectin, Laminin, Hämoglobin und Kollagen Typ VI. Zudem hat PR3 antimikrobielle Wirkung (93).

Später im Metamyelozytenstadium treten die sekundären oder spezifischen Granula auf. Sie enthalten Enzyme wie Lysozym, Lactoferrin oder Kollagenase (91), aber auch einige Rezeptoren (fMLP-Rezeptor, Adhäsionsmoleküle), welche nach Stimulation an die Zelloberfläche transloziert werden können (94). Die tertiären Granula spielen in der Pathogenese der AASV keine entscheidende Rolle, auch sie enthalten Membranproteine, Proteinasen, saure Hydrolasen. Die sogenannten sekretorischen Vesikel sind in murenen Granulozyten zu finden. Auch in diesen Granula ist die Proteinase 3 lokalisiert. Die sekretorischen Vesikel gehören zu den leicht mobilisierbaren intrazellulären Kompartimenten. Durch die Fusion der Granulamembran mit dem Phagolysosom oder der Zellmembran wird der Granulainhalt in das Phagolysosom oder in den Extrazellulärraum abgegeben (91).

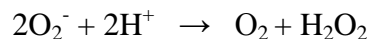
Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Der Sauerstoffverbrauch der neutrophilen Granulozyten steigt während der Phagozytose um das 50-100 fache an (95). Während des sogenannten „respiratory burst“ werden aufeinander folgend verschiedene reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet.

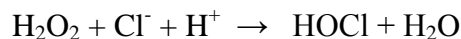
Initial entsteht das Superoxidanion (O_2^-) durch die Reduktion von molekularem Sauerstoff, wobei hier das im Pentosephosphatweg gebildete NADPH (Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat) als Elektronendonator fungiert. Dieser Prozess wird katalysiert durch die NADPH-Oxidase, einem Multienzymkomplex, der aus Cytochrom *b*-abhängigen, membranständigen (gp91phox, p22phox, Rap1A) sowie aus zytosolischen Komponenten (p47phox, p67phox, Rac2) zusammengesetzt wird. Im aktivierten Granulozyten assoziieren diese Komponenten und bilden das aktive Enzym (91).



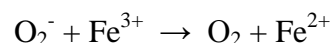
Das Superoxidanion besitzt keine ausgeprägte mikrobizide Wirkung, es dient als Vorstufe für die Generierung reaktiverer ROS. Hydrogenperoxid (H_2O_2) wird meist spontan gebildet, die Reaktion kann durch die Superoxid-Dismutase (SOD) katalysiert werden.



H_2O_2 kann mit Cl^- -Ionen aus dem Extrazellulärraum MPO-abhängig in Hypochlorsäure (HOCl) umgewandelt werden (92).



Von Granulozyten freigesetzte Elastase wird in Endothelzellen zu Xanthinoxidase umgewandelt und unterstützt die Bildung von endothelalem O_2^- , welches wiederum die Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} veranlasst.



Hydrogenperoxid kann in das Zytosol der Endothelzellen diffundieren und dort in Anwesenheit von Fe^{2+} haltigen Verbindungen zum hochreaktiven, zytotoxischen Hydroxylradikal (OH°) reduziert werden.



Die intrazellulär in den Endothelzellen gelegene NO-Synthase katalysiert die Bildung von Nitritoxid (NO°), welches die endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen hemmt. NO° kann mit Superoxidanion O_2^- zum hochreaktiven Peroxynitritanion ($ONOO^\circ$) reagieren. Die Schädigung von Endothelzellen durch aktivierte PMN geschieht einmal durch granulozytäre (Elastase, H_2O_2), aber auch durch endotheliale Reaktionsprodukte (Fe , O_2^-) (96).

2.7.3 Regulation der Aktivität von neutrophilen Granulozyten

Die Aktivität von neutrophilen Granulozyten wird über ein komplexes Netzwerk bestimmt. Es wirkt eine Vielzahl von endokrinen, nervalen, kardiovaskulären Mediatoren, sowie Produkte des Immunsystems selbst. Zytokine sind immunregulatorische Mediatoren die in der Regel von Zellen des Immunsystems produziert werden. Neutrophile Granulozyten sind sowohl Quelle als auch Ziel dieser Botenstoffe. IL-1,-6,-8, TNF α oder hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie GM-CSF („granulocyte macrophage colony-stimulating factor“) wirken para- und autokrin, unter pathologischen Bedingungen sind sie auch systemisch zu finden. Es sind pro-inflammatorische Mediatoren, die in der akuten Phase der Immunreaktion abgegeben werden und an der Entstehung der Entzündungszeichen beteiligt sind. Neutrophile Granulozyten werden in einen voraktivierten Zustand versetzt („priming“), was sich in einer veränderten Expression verschiedener Oberflächenmoleküle äußert und eine verstärkte Antwort auf einen nachfolgenden Stimulus bewirkt (92). IL-1, -6 und TNF α führen zu einer Aktivierung der granulozytären NADPH-Oxidase, IL-8 ist zudem ein potentes Chemokin (91). Sie bewirken eine Mobilisierung von Proteinen aus Muskulatur und Fettgewebe, eine Aktivierung von B- und T-Lymphozyten sowie eine Erhöhung der Körpertemperatur im Hypothalamus (97).

Bioaktive Lipide wie LTB₄ oder der PAF haben starke pro-inflammatorische Wirkung. PAF fördert direkt die Superoxidproduktion und Elastase Freisetzung (92).

Demgegenüber haben IL-4 und -10 anti-inflammatorische Wirkung, unter anderem über eine Verminderung der neutrophilen Zytokin-Produktion (91).

Zytokine aktivieren neben den Zellen des Immunsystems auch Endothelzellen und haben so Einfluss auf die Interaktion zwischen beiden (98). Auch in der Pathogenese der AASV scheinen pro-inflammatorische Mediatoren eine wichtige Rolle zu spielen. So aktivieren ANCA voraktivierte PMN wirkungsvoller, bei Patienten mit aktiver WG findet sich ein erhöhter Zytokinspiegel (TNF α , IL-1,-6,-8) (99). In einem Maus-Modell verhinderte die Gabe von Anti-TNF α -Antikörpern den synergistischen Effekt von pro-inflammatorischen Mediatoren auf die Anti-MPO induzierte Glomerulonephritis (100).

2.7.4 FMLP aktiviert neutrophile Granulozyten

N-formylierte Peptide wie fMLP werden von Bakterien als Nebenprodukt der bakteriellen Proteinsynthese gebildet und sind potente Chemokine, die eine Rekrutierung der Leukozyten hin zum Entzündungsherd bewirken (101). Neutrophile Granulozyten exprimieren zwei

funktionale fMLP Rezeptoren, FPR („formyl peptide receptor“) und FPRL1 („low affinity formyl peptide receptor-like-1“) (102). Diese gehören der Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren an und besitzen sieben transmembranöse Anteile (103). Bindung von fMLP aktiviert verschiedene Signaltransduktionswege in der Zelle. Die Aktivierung von PLC, PLD, PLA₂ und PI3-K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) führt zur Freisetzung von „second messenger“, wie IP₃, DAG oder Ca²⁺, deren Interaktion mit einer Reihe von intrazellulären Kinasen, der PKC (Proteinkinase C) oder MAP-Kinasen („mitogen-activated protein kinases“), Veränderungen in der Zelle bewirken, welche u.a. zu einer Umstrukturierung des Aktin Zytoskeletts, der Aktivierung von Integrinen und einer gerichteten Migration führen (104–107). FMLP induziert zudem die Sekretion von ROS, Arachidonsäure-Metaboliten und die neutrophile Degranulierung (108). Diese Mechanismen spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen sowie im Rahmen der Immunabwehr.

2.7.5 Beendigung der Aktion von neutrophilen Granulozyten

Eine lokale Begrenzung oder Beendigung der Entzündungsreaktion erfolgt durch die Beseitigung des infektiösen Agents durch Phagozytose sowie durch die endogene Sekretion von „Abbruch-Signalen“ oder „switch-off-signals“. Diese bewirken zum einen eine Verringerung der Extravasion und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, zum anderen führen sie das Gefäßendothel in einen nicht aktivierten Zustand zurück und fördern die Apoptose der neutrophilen Granulozyten und deren anschließende Phagozytose durch Makrophagen (91, 96).

Wichtige Mediatoren sind die von Makrophagen und T-Zellen produzierte IL-10, IL-13 oder IL-4. Auch der „secretory leukocyte protease inhibitor“ ist ein wirksamer anti-inflammatorischer Botenstoff, der bei entzündlichem Geschehen in der Lunge verstärkt produziert wird (96).

Die neutrophile Apoptose (der programmierte Zelltod) und anschließende Phagozytose durch Makrophagen ist der Hauptmechanismus, über den die Granulozyten-Konzentration am Entzündungsort gesenkt wird (91). Dabei bleibt die Plasmamembran apoptotischer neutrophiler Granulozyten intakt, so wird eine Freisetzung zytotoxischer, neutrophiler Produkte verhindert. Das Erscheinen von Phosphatidylserin (PS) auf der Membranoberfläche und der Verlust der Membran-Phospholipid Asymmetrie sind Anzeichen einer beginnenden Apoptose. Neben diesen Rezeptoren für PS besitzen Makrophagen weitere Oberflächenrezeptoren, so kann es über die Interaktion von CD36 und Thrombospondin zur

Brückenbildung von Makrophagen und apoptotischem Granulozyt mit nachfolgender Phagozytose kommen. Die Phagozytose von Granulozyten durch Makrophagen findet ohne Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren statt (109).

2.7.6 Rolle der Granulozyten im Rahmen der AASV

Neutrophile Granulozyten spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der ANCA – assoziierten Vaskulitiden. Histologisch finden sich in den kleinen Gefäßen und deren Umgebung Infiltrate neutrophiler Granulozyten (1). Sie können pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine freisetzen und bei inadäquater Aktivierung durch die extrazelluläre Freisetzung von mikroziden Metaboliten oder beim Ausbleiben einer Beendigung der Entzündungsantwort zu einer Gewebeschädigung führen (109). So korreliert das Vorhandensein aktivierter PMN in der Niere mit dem Ausmaß der renalen Schädigung (49).

In der Mikrozirkulation der Lunge findet sich auch unter physiologischen Bedingungen ein großer Pool von neutrophilen Granulozyten, welcher in kurzer Zeit deutlich vergrößert werden kann (110). Bei Patienten mit aktiver WG ist in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit eine deutlich höhere PMN-Konzentration als in Kontrollgruppen nachgewiesen worden (111).

IL-8 ist ein wichtiger chemotaktischer und pro-inflammatorischer Faktor und wird *in-vitro* von ANCA aktivierten geprimten PMN produziert. TNF α geprimte PMN „downregulieren“ (*in-vitro*) ihre IL-8 Rezeptoren CXCR 2. Sie können so dem chemotaktischen Gradienten weniger gut folgen, verbleiben im Gefäßlumen und die anschließende granulozytäre Entzündungsantwort richtet sich gegen das Endothel (109).

TNF α aktivierte PMN, die mit ANCA inkubiert werden, zeigen eine dysregulierte und beschleunigte Apoptose, was dazu beiträgt, dass Gewebeschäden und sekundäre Nekrosen auftreten. Die Abfolge der morphologischen Veränderungen ist beschleunigt und geschieht ohne Expression von PS, einem wichtigen „eat-me“ Signal an der granulozytären Oberfläche. Makrophagen erkennen so apoptotische PMN nicht und die Verweildauer der PMN im Entzündungsgebiet ist verlängert. Apoptotische PMN exprimieren vermehrt PR3- und MPO-Antigene auf der Oberfläche. Mit ANCA opsonierte apoptotische PMN induzieren die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-8) durch phagozytierende Makrophagen und unterstützen so ein Andauern der Entzündungsreaktion (112).

PMN sind für die Entstehung der vaskulären Schäden entscheidend. So verhindert die Behandlung von Mäusen mit einem monoklonalen Antikörper (NIMP-R14), der die Anzahl

der neutrophilen Granulozyten weitgehend dezimiert, vollständig die Entstehung einer Glomerulonephritis nach der Gabe von Anti-MPO-IgG (113).

2.8 Hypothetisches Modell der ANCA abhängigen leukozytär-endothelialen Interaktion

In-vitro Studien haben gezeigt, dass ANCA neutrophile Granulozyten aktivieren, was zu Degranulierung azurophiler Granula und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine sowie der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies führt (8, 114). Voraussetzung für die Interaktion c-ANCA und Granulozyt ist die Translokation des Zielantigens PR3 aus den azurophilen Granula auf die granulozytäre Membran-Oberfläche, was durch die Aktivierung („priming“) von neutrophilen Granulozyten mit pro-inflammatorischen Zytokinen erreicht wird. TNF α , IL-8 oder γ -Interferon führen zudem zu einer verstärkten Expression von neutrophilen Adhäsionsmolekülen wie β_2 -Integrinen auf der Zelloberfläche und der Clusterbildung des Fc γ RIIa-Rezeptors und β_2 -Integrinen sowie zur Translokation der NADPH-Oxidase an die Membran-Oberfläche (6). Auch die Bindung von ANCA selbst induziert bei aktivierten und adhärenen Granulozyten eine erhöhte Membranexpression von PR3 (115).

In-vivo scheint diese Vorstimulierung ebenso von Bedeutung (100), wobei CD⁴⁺/CD²⁸⁻ T-Zellen eine mögliche Quelle der zirkulierenden pro-inflammatorischen Zytokine wie TNF α und IFN γ sind (116).

Für die Aktivierung des Granulozyten durch ANCA reicht die Bindung des „antigen binding fragment“ F(ab')₂ an die mPR3 nicht aus, zusätzlich ist die Bindung des Fc-Fragmentes an den granulozytären Fc γ RIIa-Rezeptor nötig (117).

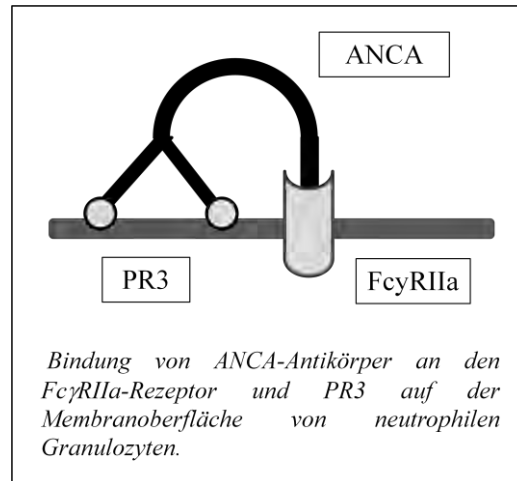


Abbildung 7:

Die freigesetzten Sauerstoffradikale und lysosomalen Enzyme führen zu einer Schädigung der endothelialen Barriere und einem Anstieg der endothelialen Permeabilität. Es kommt zu einem vermehrten Übertritt von Makromolekülen, Leukozyten und Flüssigkeit über die Gefäßwand in das Interstitium (118).

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien und Lösungen

3.1.1 Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten

- Ammoniumchlorid-Puffer :
8,3 g Ammoniumchlorid (NH_4Cl) (Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland)
1 g Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
0,037g Natrium-EDTA-Triplex (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
1000 ml Aqua destillata
- Dextran-T500 (Pharmacia AB, Uppsala, Schweden)
- Ficoll-Paque (Pharmacia AB, Uppsala, Schweden)
- Phosphate-Buffered-Saline (PBS^{-/-}-Puffer) 1x (sine Ca^{2+} , Mg^{2+})

3.1.2 Durchflußzytometrie

- BSA (bovines Serum-Albumin, fettsäurenfrei) (Calbiochem, La Jolla, USA)
- Ficoll-Paque (Pharmacia AB, Uppsala, Schweden)
- Phycoerythrin-markierter Goat-anti-Mouse-Antikörper (Coulter Immunotech, Hamburg, Deutschland)
- Mouse-IgG₁, Isotype control (Dianova, Hamburg, Deutschland)
- Mouse-Anti CD45 Antikörper, monoclonal (Abcam, Cambridge, UK)

3.1.3 Messung granulozytärer Funktionsparameter „respiratory burst“

- Cytochrom C (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- SOD (Superoxid-Dismutase) (Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland)
- $\text{TNF}\alpha$ (Tumor-nekrose-faktor-alpha, human, rekombinant)
(Boehringer, Mannheim, Deutschland)
- HH^{+/+}
6g HEPES (Carl Roth GmbH+CoKG, Karlsruhe, Deutschland)
+ 100ml HBSS ^{+/+}
+ 900 ml Aqua bidest
mit NaOH aus pH 7,4 einstellen
- ANCA (“anti-neutrophil cytoplasmic antibodies”)

monoklonaler, muriner Antikörper gegen Proteinase 3 , Subclass IgG1 Clone 4A5
(Wieslab AB, Lund, Schweden)

- fMLP (N-Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin)
(Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland)
- 12 well-plate (Corning Incorporated, Deutschland)
- Küvetten zur photometrischen Messung
(Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)

3.1.4 Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

- Collagenase lyophilized Type II (Worthington, Lakewood, USA)
25 mg Collagenase
+100 ml Hank`s Buffered Salt Saline (HBSS) (PromoCell, Heidelberg, Deutschland)
- Endothelial Cell Growth Medium Kit (PromoCell, Heidelberg, Deutschland)
+ FCS 10 % (Fetal Calf Serum) (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
+ Penicillin (10000 U/ml) / Streptomycin (10 mg/ml)
(PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- Zellkulturschale 100 mm x 20 mm
(Primaria tissue-culture-dish, BD Flacon, Heidelberg, Deutschland)

3.1.5 Isolierung und Kultivierung von Rattenlungen Endothelzellen (RLEC: Rat Lung Endothelial Cells)

- Petri-Schale, 60 mm x 15 mm
(tissue-culture-dish, BD Falcon, Heidelberg, Deutschland)
+ FCS (Fetal Calf Serum) (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
+ Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)
(PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- Collagenase cis, c-1-22, 200 U/ml (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- RPMI 1640 (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- Medicons (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Medimachine (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Endothelial Cell Growth Medium Kit (PromoCell, Heidelberg, Deutschland)

- + FCS 10 % (Fetal Calf Serum) (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- + Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)
(PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- Zellkulturschale 100 mm x 20 mm
(Primaria tissue-culture-dish, BD Flacon, Heidelberg, Deutschland)

3.1.6 Passagierung und Kultivierung von Endothelzellen

- RPMI 1640 (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- Trypsin-EDTA 0,05% (Gibco Laboratories, Karlsruhe, Deutschland)
- Zellkulturschale 100 mm x 20 mm
(Primaria tissue-culture-dish, BD Flacon, Heidelberg, Deutschland)
- Endothelial Cell Growth-Medium-Kit (PromoCell, Heidelberg, Deutschland)
 - + FCS 10 % (Fetal Calf Serum) (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
 - + Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)
(PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- 24 mm Transwell with 0,4 µm Pore Polycarbonat Membrane Insert,
(Corning B.V. Life Sciences, Schiphol-Rijk, Niederlande)

3.1.7 Messung der Makromolekülpermeabilität

- 24 mm Transwell with 0,4 µm Pore Polycarbonat Membrane Insert,
(Corning B.V. Life Sciences, Schiphol-Rijk, Niederlande)
- TNFα (Tumor-nekrose-faktor-alpha, human, rekombinant)
(Boehringer, Mannheim, Deutschland)
- ANCA („anti-neutrophil cytoplasmic antibodies”)
monoklonaler muriner Antikörper gegen Proteinase 3, Subclass IgG1 Clone 4A5
(Wieslab AB, Lund, Schweden)
- fMLP (N-Formyl-Methionin-Leucin-Phenylalanin)
(Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland)
- SOD (Superoxid-Dismutase) (Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland)
- DPI (Diphenyleneiodium chloride, Inhibitor der NADPH-Oxidase)
(Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland)
- MOUSE IgG1κ (MOPC-21) Mouse Isotype Control

- (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland)
- Anti-CD 54 (Anti-ICAM) Antikörper, Mouse Anti-Rat Monoclonal Antibody, IgG₁
(BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- HBSS +/-
HBSS (PAA, Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)
+ 1,3 mM Ca²⁺ (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
+ 1,2 mM Mg²⁺ (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Trypan-Blau Stocklösung 10 x
200mg Trypan-Blau (Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland)
+ 4,8 g Albumin, bovine, essentially acid free (Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland)
+ 120 ml HBSS +/-
- RPMI 1640 (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland)
- Spectrophotometer (Specord10, Zeiss Jena, Deutschland)

3.1.8 Verbrauchsmaterialien

- Perfusorspritze, 60 ml, steril, (B.Braun AG, Melsungen, Deutschland)
- Pasteur-Pipette, steril, long size (WU Mainz, Deutschland)
- Propylene-Röhrchen, 50/10ml
(Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- Polypropylene-Pipette, 25 und 50 ml (Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland)
- Eppendorf-Cups (Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Deutschland)
- Kanülen 19G und 20G (Terumo Deutschland GmbH, Eschborn, Deutschland)
- 3-Wege-Hahn (B.Braun AG, Melsungen, Deutschland)
- Kabelbinder (Cimco, Remscheid, Deutschland)
- Nadeladapter mit PEP-Schlauch (B.Braun AG, Melsungen, Deutschland)
- Klemme (Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland)
- steriles Einmalskalpell (Cutfix, B.Braun AG, Melsungen, Deutschland)
- Einwegspritze 2 ml (B.Braun AG, Melsungen, Deutschland)
- Heraeus Multifuge (Thermo Electron LED GmbH, Osterode, Deutschland)
- Durchflußzytometer FACS (Becton Dickenson, Heidelberg, Deutschland)

3.2 Methoden

3.2.1 Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten

Nach der Methode von Boyum (119) wurden neutrophile Granulozyten (PMN) aus dem peripheren Blut über einen Ficoll-Gradienten gewonnen. Die Isolationsdauer betrug ca. 2h und fand unter sterilen Bedingungen und bei Raumtemperatur (20-25°C) statt. Es wurde venöses Blut von gesunden Spendern im Alter von 20-25 Jahren verwendet.

Mit einer Kanüle der Größe 19G erfolgte die Blutentnahme durch Punktion der peripheren Vene in der Armbeuge. Das entnommene Blut wurde in eine mit 0,125% EDTA gefüllte sterile 60 ml Perfusorspritze aspiriert und danach in einem Mischverhältnis von 2:1 in ein mit Dextran-Lösung vorgefülltes steriles 50 ml-Propylene-Röhrchen überführt und 30 min bei 37°C und 5% CO₂ Begasung inkubiert.

Ca. 25 ml des Überstandes wurden mit einer sterilen 25 ml-Propylene-Pipette entnommen und je 15 ml vorsichtig auf 10 ml Ficollösung aufgeschichtet, welche in einem sterilen 50 ml-Propylene-Röhrchen vorgelegt worden war.

Der folgende Zentrifugationsschritt, 20 min bei 250 x g, bewirkt eine Auftrennung von thrombozytenreichem Plasma, mononukleären Zellen (Mono - und Lymphozyten) sowie Granulo- und Erythrozyten. Die beiden letztgenannten Zellpopulationen finden sich im Pellet am Boden des Propylene-Röhrchens.

Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 8 ml Ammoniumchlorid-Lösung resuspendiert und 5 min auf Eis gestellt. Die Zugabe von Ammoniumchlorid führt zur Lyse der Erythrozyten.

Es folgten 5 min Zentrifugation bei 110 x g und die Resuspension des Pellets in 50 ml PBS. Dieser Schritt wurde 2 x wiederholt.

Zwischen den Zentrifugationsritten wurde durch lichtmikroskopische Zählung mit Hilfe der Neubauerzählkammer die Zellzahl ermittelt. Im Durchschnitt ließen sich aus 60 ml Blut ca. 6×10^6 neutrophile Granulozyten isolieren.

In regelmäßigen Abständen wurde die Reinheit der isolierten Granulozyten über Differentialblutbilder kontrolliert. Sie ergaben einen PMN Anteil von 97%. Mono - und Lymphozyten waren mit je 1% vertreten, die restlichen Zellen wurden als eosinophile und basophile Granulozyten identifiziert. Die Zellvitalität wurde mit Hilfe der Trypan-Blau-Ausschluss-Methode und der LDH - Freisetzung überprüft, wobei 98% der PMN am Ende der

Isolation vital waren. Die spontane LDH-Freisetzung der PMN wurde auf die durch das Bienengift Mellitin hervorgerufene absolute Enzymfreisetzung bezogen und lag immer unter 3%.

3.2.2 Analyse der Proteinase 3 Membranexpression: Durchflußzytometrie

Die Bestimmung der granulozytären PR3-Membranexpression wurde in einem FACS-Gerät („fluorescence-associated cell sorter“) durchgeführt. Mittels Durchflußzytometrie können zelluläre Oberflächenantigene nachgewiesen werden. Die Zellen werden mit einem Primärantikörper, gerichtet gegen das nachzuweisende Antigen, und einem fluoreszierenden Sekundärantikörper inkubiert. Die im FACS gemessene Intensität der Fluoreszenz entspricht indirekt der Expression des nachzuweisenden Antigens.

Den PMN ($5 \times 10^6/\text{ml}$) wird zur Membranstabilisierung 1ml eisgekühlter PBS mit jeweils 1% BSA und Natrium-Azid (PBS A/B) zugesetzt. Die weiteren Schritte werden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen werden gewaschen ($300 \times g$, 5 min) und mit einer Zelldichte von $5 \times 10^6/\text{ml}$ in PBS A/B aufgenommen. Die PMN werden mit 500.000 Zellen pro well auf einer 96-well-plate verteilt. Nach Blockade der Fc-Rezeptoren durch die Zugabe von 20µl/well gepooltem humanem Immunglobulin (1mg/ml) werden 20µl/well des Anti-PR3-Antikörper (50µg/ml) zugegeben. Isotyp Maus-Kontroll-IgG dient als Negativkontrolle, muriner Anti-CD45-Antikörper gegen das konstitutiv exprimierte Leukozytenantigen CD45 dient als Positivkontrolle. Nach 30 minütiger Inkubationszeit und einem Waschschrift ($300 \times g$, 5 min) werden 20µl/well des Sekundärantikörpers (Pycoerythrin-markierter Ziege-anti-Maus Antikörper, 50µg/ml) zugegeben und 30 min inkubiert. Nach 3 maligem Waschen ($300 \times g$, 5 min) wird die Fluoreszenz im Cytometer analysiert. Die Durchflußzytometrie zur Bestimmung der PR3 Expression wurde von Frau Bettina Schmidt unter Anleitung von Frau Dr. Katja Hattar in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Lohmeyer, Med. Klinik II, Gießen durchgeführt.

3.2.3 Messung granulozytärer Funktionsparameter: „respiratory burst“

Die Aktivierung des „respiratory burst“ wurde über eine Messung des Superoxidanions O_2^- , des primären Reaktionsproduktes der granulozytären NADPH-Oxidase, festgestellt. Superoxidanion induziert die Reduktion von Cytochrom C, was photometrisch nach der

Methode von Cohen (120) erfasst wurde. Neutrophile Granulozyten wurden zusammen mit TNF α (1ng/ml) 30 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ Begasung inkubiert („priming“).

Alle Proben wurden paarweise angesetzt und enthielten 5 Mio Granulozyten und 75 μ M Cytochrom C, wobei einem der Ansätze Superoxiddismutase (10 μ g/ml) zugesetzt wurde, welches selektiv die O₂-abhängige Cytochrom C-Reduktion hemmt. Nach der Inkubation erfolgte im Wasserbad bei 37°C die Stimulation der Granulozyten mit Anti-PR3-Antikörpern (10 μ g/ml). Nach 10 min wurde die Reaktion durch Kühlung auf Eis und anschließende Zentrifugation bei 4°C (1200 x g, 5 min) abgestoppt. Der Überstand wurde im Photometer bei 546 nm analysiert, wobei jeweils die Extinktion gegen den SOD enthaltenden Parallelansatz gemessen wurde. Die Cytochrom C-Reduktion, die aus der Differenz der beiden Ansätze resultiert, lässt somit einen Rückschluss auf die Menge des gebildeten Superoxidanions zu.

3.2.4 Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

Die Isolation der Endothelzellen erfolgte nach der von Jaffe (121) beschriebenen Methode. Die verwendeten Nabelschnüre sind von der gynäkologischen Abteilung des Klinikums Wetzlar zur Verfügung gestellt worden. Sie wurden direkt nach der Abnabelung in sterile Becher gegeben und max. 48 h bei 4-8 °C aufbewahrt. Die Bearbeitung erfolgte in einer sterilen Werkbank.

Unverletzte Nabelschnüre von mind. 15 cm Länge wurden mit einer sterilen Kompresse gesäubert und an jedem Ende wurde 1 cm Gewebe mit einem sterilen Skalpell entfernt. An einem Ende wurde in die Vene eine Knopfkanüle mit einem Drei-Wege-Hahn eingeführt und mit einem Kabelbinder befestigt.

Es folgte die zweimalige Spülung der Nabelschnur mit 50 ml HBSS, um Blutreste innerhalb der Vene zu entfernen. Am anderen Ende der Nabelschnur wurde die Vene mit einem Nadeladapter kanüliert und der daran befestigte Schlauch mit einer Klemme verschlossen.

Mit einer 50 ml Perfusorspritze wurde 0,025 % Collagenase-Lösung in die Vene eingefüllt, bis diese prall gefüllt war, anschließend wurde der Drei-Wege-Hahn verschlossen. Es folgten 20 min Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Begasung. Um eine bessere Mobilisierung der Endothelzellen zu erreichen, wurde die Nabelschnur vorsichtig massiert. Mit 30 ml HBSS erfolgte nach dem Öffnen der Schlauchklemme die Spülung der

Nabelschnur und die Überführung des Inhaltes in ein steriles, mit ca. 1 ml FCS vorgefülltes 50 ml Propylene-Röhrchen.

Nach 5 min Zentrifugation bei 250 x g wurde das Zellpellet in 15 ml Wachstumsmedium resuspendiert und mit einer sterilen 25 ml Polypropylene-Pipette in eine Primaria Kulturschale überführt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂-Begasung im Brutschrank inkubiert. Ein Wechsel des Kulturmediums fand alle 48 h statt. Nach 3-4 Tagen erreichten die Zellen Konfluenz.

Die Identifikation der Endothelzellen erfolgte mikroskopisch anhand der typischen Pflasterstein-Morphologie.

2.2.5 Isolierung und Kultivierung von Koronar-Endothelzellen aus der Ratte (RCEC: Rat Coronary Endothelial cells)

Die Koronar-Endothelzellen wurden freundlicherweise vom Physiologischen Institut der JLU Gießen zur Verfügung gestellt. Die Endothelzellen wurden dort in Anlehnung an die Methode von Piper H.M. (122) aus männlichen Wistar-Ratten (200-250g) isoliert. Die Tiere stammten aus hauseigener Züchtung des Physiologischen Instituts der JLU Gießen.

3.2.6 Isolierung und Kultur von Lungen-Endothelzellen aus der Ratte (RLEC: Rat Lung Endothelial Cells)

Zur Isolierung der Lungen-Endothelzellen, wurden adspektorisch gesunden männlichen Wistar-Ratten (200-250g) aus hauseigener Züchtung des Physiologischen Instituts der JLU Gießen die Lungen entnommen. Nur unverändertes Lungengewebe wurde zur Isolierung der Endothelzellen verwendet.

Die Ratten wurden mittels CO₂ narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Nach Eröffnung des Thorax erfolgte die Entnahme von Herz und Lunge. Die Lungen wurden in einen mit 50 ml RPMI-Medium und 2% Penicillin/Streptomycin vorgefüllten sterilen Becher gegeben, bei 4-8°C aufbewahrt und spätestens 3 h nach der Entnahme unter sterilen Bedingungen verarbeitet.

Durchschnittlich betrug die Isolationsdauer 5 h. Von den Rändern der Lungenlappen wurde mit einem sterilen Skalpell ein ca. 1mm breiter Gewebestreifen abgetrennt, mit einer Pinzette in eine sterile 60 x 15 mm Petrischale gegeben und mit einem sterilen Skalpell zerkleinert.

Die Gewebestückchen wurden nach Zugabe von 5 ml Collagenase-Lösung (RPMI + Collagenase I, 200 U/ml) im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ Begasung inkubiert. Die Suspension wurde hin und wieder vorsichtig geschwenkt.

Nach 2 h erfolgte die Entnahme der Gewebestückchen mit einer Pinzette, sie wurden in einen Mediconfilter überführt und 2 min in der Medimachine filtriert. Nach der Filtration wurde mit einer 2 ml Spritze 1 ml RPMI-Medium auf den Filter gegeben, das Medium und die gefilterten Zellen mit einer 20G Kanüle in eine sterile 2 ml Spritze aufgenommen und in ein 15 ml Propylene-Röhrchen überführt. Dieser Schritt wurde 2-3x wiederholt.

Es folgten 5 min Zentrifugation bei 250 x g. Das Pellet wurde in 15 ml Endothelial Cell Growth Medium resuspendiert, mit einer 25 ml Polypropylene-Pipette in eine 100 x 20 mm Primaria Kulturschale überführt und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

2 h später wurde das Medium abgesaugt und verworfen. Mit einer Polypropylene-Pipette wurde 10 ml RPMI zugegeben, wiederum abgesaugt und verworfen, so dass nicht haftende Zellen entfernt wurden. Auf die verbleibenden Zellen wurden mit einer Polypropylene-Pipette 15 ml Endothelial Cell Growth Medium gegeben.

Wieder wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Begasung inkubiert und alle 48 h das Medium gewechselt, bis der Monolayer nach 8 - 10 Tagen Konfluenz erreichte.

3.2.7 Passagierung und Aussaat von Endothelzellen auf Filtermembranen

Das Wachstumsmedium der in Primaria Kulturschalen ausgesäten Endothelzellen wurde abgesaugt und verworfen, 10 ml RPMI mit einer 10 ml Polypropylene-Pipette auf die Zellen gegeben, die Kulturschalen vorsichtig geschwenkt, die RPMI-Lösung wieder abgesaugt und verworfen. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt, um so die Trypsinwirkung beeinträchtigende Serumreste zu entfernen.

Mit einer 10 ml Polypropylene-Pipette folgte die Zugabe von 6-8 ml Trypsin-Lösung auf die Zellen, sowie eine 2 minütige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂-Begasung im Brutschrank.

Lichtmikroskopisch wurde kontrolliert, ob die Zellen sich abrunden bzw. von der Unterlage lösen. Um den Ablösungsvorgang zu unterstützen, wurde die Kulturschale vorsichtig auf einer Unterlage aufgeklopft.

Die Zellsuspension wurde in eine 10 ml Polypropylene-Pipette aufgenommen und in ein mit 1 ml FCS vorgefülltes 50 ml Propylene-Röhrchen überführt.

Mit einer 10 ml Propylene-Pipette wurden 10 ml RPMI-Medium auf die noch verbleibenden Zellen gegeben und nach mehrmaligem Schwenken der Kulturschale wieder in die Pipette aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in das oben erwähnte Propylene-Röhrchen überführt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt.

Nach Entnahme von 10 µl der Zellsuspension mit einer Eppendorf-Pipette ermittelte man mit Hilfe der Neubauer Zählkammer lichtmikroskopisch die Zellanzahl.

Es folgten 5 min Zentrifugation bei 250 x g. Das Zellpellet wurde in Endothelial Cell Growth Medium resuspendiert, bei Aussaat auf Primaria-Kulturschalen in entsprechend 10 ml Medium pro Schale, bei Aussaat auf Filtermembranen entsprechend der Anzahl der Filter je 150-200.000 Zellen in 2,5 ml Medium. Alle 48 h fand ein Mediumwechsel statt. Die Endothelzellen in den Kulturschalen erreichten nach ca. 10 Tagen Konfluenz, die Endothelzellen auf den Filtermembranen nach 3 Tagen.

3.2.8 Messung der Makromolekülpermeabilität endothelialer Monolayer

Die Permeabilität des Endothelzellmonolayers wurde in einem Zweikammersystem bestimmt, getrennt durch eine Filtermembran, die auf der einen Seite von einem Endothelzellmonolayer bedeckt war (123). Beide Kammern bzw. Kompartimente enthielten als Basalmedium HBSS. Es bestand keine hydrostatische Druckdifferenz zwischen beiden Kompartimenten. Das „luminale“ Kompartiment enthielt den Zellmonolayer und hatte ein Volumen von 2,5 ml, das „abluminale“ Kompartiment hatte ein Volumen von 9,5 ml. Das Medium hier wurde kontinuierlich bewegt. Im luminalen Kompartiment wurde Trypan-Blau markiertes Albumin (60 µM) zugegeben.

Das Erscheinen des markierten Albumins im abluminalen Kompartiment wurde fortlaufend mit einem Spektrophotometer gemessen und aufgezeichnet. Dazu wurde das Medium rezirkulierend über eine Durchflussskivette des Spektrophotometers gepumpt.

Das Photometer arbeitete in einem zwei-Längenmodus (Wellenlänge zur Trypan-Blau-Messung 600 nm, versus Kontroll-Wellenlänge 720 nm). Ein Anstieg der Konzentration des markierten Albumins im abluminalen Kompartiment wurde mit einer Zeitverzögerung von weniger als 15 Sek. erfasst.

Die Konzentration des markierten Albumins im luminalen Kompartiment wurde während der Inkubationszeit alle 10 min erfasst, um sicherzustellen, dass im Verlauf des Experiments keine signifikante Änderung erfolgte. Der Albuminfluß (F , angegeben in $\text{mol}/(\text{sec} \times \text{cm}^2)$)

durch die Endothelzellschicht mit der Fläche (S) wurde bestimmt durch den Anstieg der Albuminkonzentration ($d(A)_2$) während des Zeitintervalls (dt) im abluminalen Kompartiment mit dem Volumen (V):

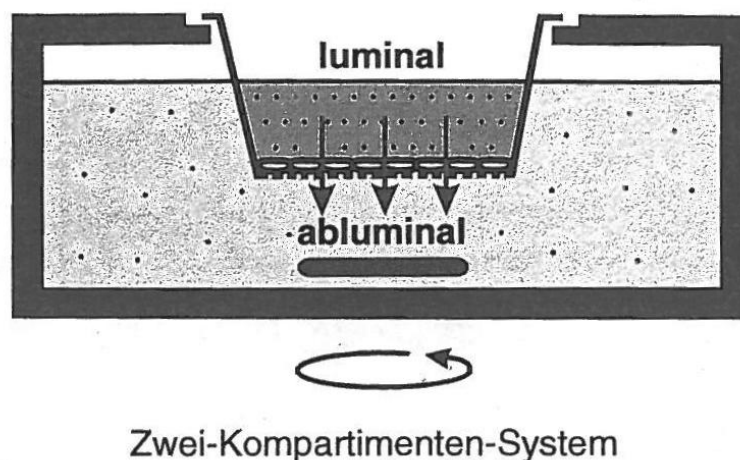
$$F = \frac{d(A)_2 / dt \times V}{S}$$

Der Permeabilitätskoeffizient (P, angegeben in cm/s) des Systems aus Endothelzellmonolayer und Filtermembran wurde wie folgt berechnet:

$$P = \frac{F}{((A)_1 - (A)_2)}$$

wobei $(A)_1$ und $(A)_2$ die Albuminkonzentration im luminalen und im abluminalen Kompartiment darstellen. Da die treibende Kraft $((A)_1 - (A)_2)$ im Laufe des Experiments praktisch konstant blieb, entsprechen die relativen Veränderungen (F) denen des Permeabilitätskoeffizienten (P).

Unter diesen Bedingungen blieb der Albuminfluss von unbehandelten endothelialen Monolayern während der gesamten Beobachtungszeit konstant.



(Inaugural-Dissertation, Dursun Gündüz, JLU-Giessen 2003)

Abbildung 8:

Die Endothelzellen (1. oder 2. Passage) wurden in einer Dichte von $15\text{-}20 \times 10^4$ Zellen/cm² auf Polycarbonat-Filter (Porengröße 0,4 µm) ausgesät. Drei Tage später erfolgte die Durchführung der Experimente mit dem nun konfluenten Endothelzell-Monolayer.

Nach einer Inkubationszeit von 30 min mit TNFα (1ng/ml) und einem letzten Zentrifugationsschritt (110 x g, 5 min) werden die aktivierten Granulozyten ($2,5 \times 10^6$ /ml) zusammen mit dem Basalmedium (HBSS) und dem Trypan-Blau markierten Albumin (60 µM) zu Beginn des Experimentes in einem Volumen von 2 ml in das luminale Kompartiment gegeben. Nach einer Anpassungsperiode von 50 min erfolgte die Zugabe der ANCA (10µg/ml) in einem Volumen von 125 µl. Danach erfolgte die Messung der Albumin-Permeabilität für weitere 100 min.

Die nähere Beschreibung der Zugabe weiterer Agentien folgt im Ergebnisteil. Alle Zugaben erfolgten in entsprechenden Volumina, den Kontroll-Experimenten wurde das gleiche Volumen entnommen bzw. zugesetzt. Die Experimente zur Erfassung der Makromolekülpermeabilität wurden unter Leitung und in den Räumlichkeiten von Herrn Prof. Dr. Thomas Noll im Physiologischen Institut der JLU Giessen durchgeführt. Die Wartung des Systems zur Erfassung der Permeabilität führte Herr Hermann Holzträger durch.

3.2.9 Statistische Auswertung

Alle erhobenen Daten sind als Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Signifikanzprüfung erfolgte durch die Varianzanalyse (one-way-ANOVA) und anschließenden Tukey's honest significant difference Test. Ein p-Wert von < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen (entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%).

4. Ergebnisse

4.1 Übersicht

Man nimmt an, dass die im Rahmen der Wegener'schen Granulomatose auftretenden Krankheitsvorgänge auf einer Störung der endothelialen Barrierenfunktion basieren. In der vorliegenden Arbeit sollte die endotheliale Funktionsstörung, ausgelöst durch die Interaktion von ANCA, neutrophiler Granulozyt und Endothelzelle, *in-vitro* reproduziert werden.

Hierzu wurde zunächst mittels Durchflußzytometrie gezeigt, dass eine Membranexpression des ANCA Zielantigens, der Proteinase 3, auf neutrophilen Granulozyten durch TNF α induzierbar ist. Die Fähigkeit von ANCA, bei aktivierten Granulozyten die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies („respiratory burst“) zu initiieren, wurde über eine photometrische Messung des primären Reaktionsproduktes der granulozytären NADPH-Oxidase, dem Superoxidanion, überprüft.

In einem Zweikammersystem, getrennt durch eine Filtermembran, wurde anschließend die Albumin-Permeabilität endothelialer Monolayer bestimmt. Ausdruck der Änderung der Integrität dieser Barriere ist die steigende bzw. abnehmende Albumin-Permeabilität. Verschiedene Zellarten fanden Verwendung. Es kamen humane makrovaskuläre Endothelzellen (Endothelzellen aus der Nabelschnurvene = HUVEC) sowie mikrovaskuläre Endothelzellen der Ratte (Ratten-Koronar-Endothelzellen = RCEC, sowie Ratten-Lungen-Endothelzellen = RLEC) zum Einsatz.

Neben der Aktivierung („priming“) der Granulozyten ist ihre Adhäsion am Endothel Voraussetzung für den ANCA induzierten Effekt. Aus diesem Grund wurde in einem Vorversuch (Daten nicht gezeigt) zunächst mikroskopisch ermittelt, wann eine maximale Adhäsion der PMN am endothelialen Monolayer stattfindet. Mit TNF α (1ng/ml) aktivierte PMN wurden mit Endothelzellen koinkubiert, die Zell-Adhäsion adspektorisch alle 20 Minuten lichtmikroskopisch bestimmt. 50 Minuten nach der Konfrontation von „geprimten“ Granulozyten mit dem endothelialen Monolayer war die Anzahl der adhären PMN am größten. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte dann die Zugabe der Anti-PR3-Antikörper. Als Positivkontrolle wurde der Einfluss von fMLP stimulierten PMN auf die endotheliale Barrierenfunktion untersucht. Es wird davon ausgegangen, dass die Bindung des Anti-PR3-Antikörpers an granulozytäre Oberflächenstrukturen und die damit induzierten Effekte spezifisch sind. Mit der Verwendung eines IgG Kontroll-Antikörpers sollte eine unspezifische IgG-Wirkung ausgeschlossen werden.

Der Einfluss einer Hemmung der Adhäsion von PMN an Endothelzellen auf die endotheliale Permeabilität wurde durch die Blockade des ICAM-1 Rezeptors mit einem monoklonalen Antikörper überprüft.

Reaktionsprodukte des neutrophilen „respiratory burst“ werden für die Schädigung des Endothels mitverantwortlich gemacht. Die Wirkung einer möglichen Neutralisierung dieser Reaktionsprodukte bzw. einer möglichen Inhibition der NADPH-Oxidase wurde mit Hilfe der Substanzen SOD (Superoxid-Dismutase) und DPI (Diphenyleneiodium chloride) untersucht.

Bei der Erläuterung der Ergebnisse wird der Begriff ANCA als Synonym für den monoklonalen Anti-PR3-Antikörper verwendet.

4.2 Membranexpression von Proteinase 3 auf neutrophilen Granulozyten

TNF α induziert die Membranexpression von PR3 auf neutrophilen Granulozyten.

Zur Ermittlung der experimentellen Bedingungen, die zu einer Translokation der PR3 an die Membranoberfläche führen, wurden neutrophile Granulozyten verschiedener Spender mit steigenden Konzentrationen TNF α über unterschiedliche Zeitperioden inkubiert. Als optimales TNF α „priming“ stellte sich eine 30 minütige Vorinkubation mit 1,0 bis 2,0 ng/ml TNF α heraus. Die PR3- Oberflächenexpression wurde mittels Durchflußzytometrie ermittelt. Abbildung 9 zeigt eine repräsentative Analyse der PR3 Membranexpression auf unbehandelten und aktivierten PMN. Aktivierte PMN zeigen eine deutliche Membranexpression von PR3, während auf unbehandelten PMN nur eine sehr schwache Membranexpression von PR3 festzustellen ist.

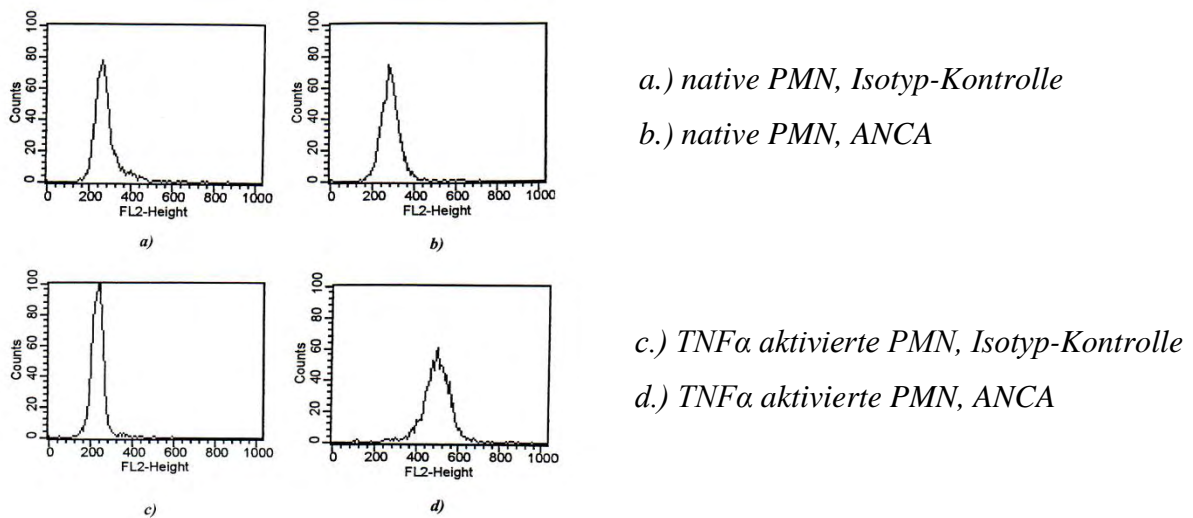


Abbildung 9:

PR3-Membranexpression von unbehandelten und TNF α -geprimten PMN 5×10^6 PMN/ml wurden für 30 Minuten mit 2,0 ng TNF α /ml inkubiert oder in unbehandeltem Zustand belassen. Die y-Achse gibt die Zellzahl an, während die Fluoreszenzintensität (FL2-Height) auf der x-Achse dargestellt ist und der PR3-Oberflächenexpression entspricht. Aktivierte PMN exprimieren deutlich mehr PR3 auf der Membranoberfläche als unbehandelte (native) PMN.

4.3 ANCA induzierte Aktivierung des neutrophilen „respiratory burst“

ANCA induziert die granulozytäre Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies.

Eine mögliche Aktivierung des neutrophilen „respiratory burst“ durch die Interaktion Granulozyt und ANCA wurde über eine Messung des Superoxidanions O_2^- , des primären Reaktionsproduktes der granulozytären NADPH-Oxidase überprüft. Aktivierte Granulozyten (5 Mio/ml) wurden mit ANCA (10 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Nach 10-minütiger Stimulation erfolgte die photometrische Analyse der Reaktionsprodukte.

Es zeigte sich eine signifikant höhere Absorptionsrate ($0,276 \text{ OD} \pm 0,096 \text{ SEM}$) derjenigen Proben, die ANCA aktivierte Granulozyten enthielten, im Vergleich zu den Kontrollproben ($0,013 \text{ OD} \pm 0,004 \text{ SEM}$), denen nur aktivierte Granulozyten zugesetzt wurden (Abb.10). Als Positivkontrolle wurden PMN mit dem Standardstimulus fMLP aktiviert, auch hier zeigten diese Proben eine signifikant höhere Absorptionsrate ($0,55 \text{ OD} \pm 0,03 \text{ SEM}$) im Vergleich zu den Kontrollproben.

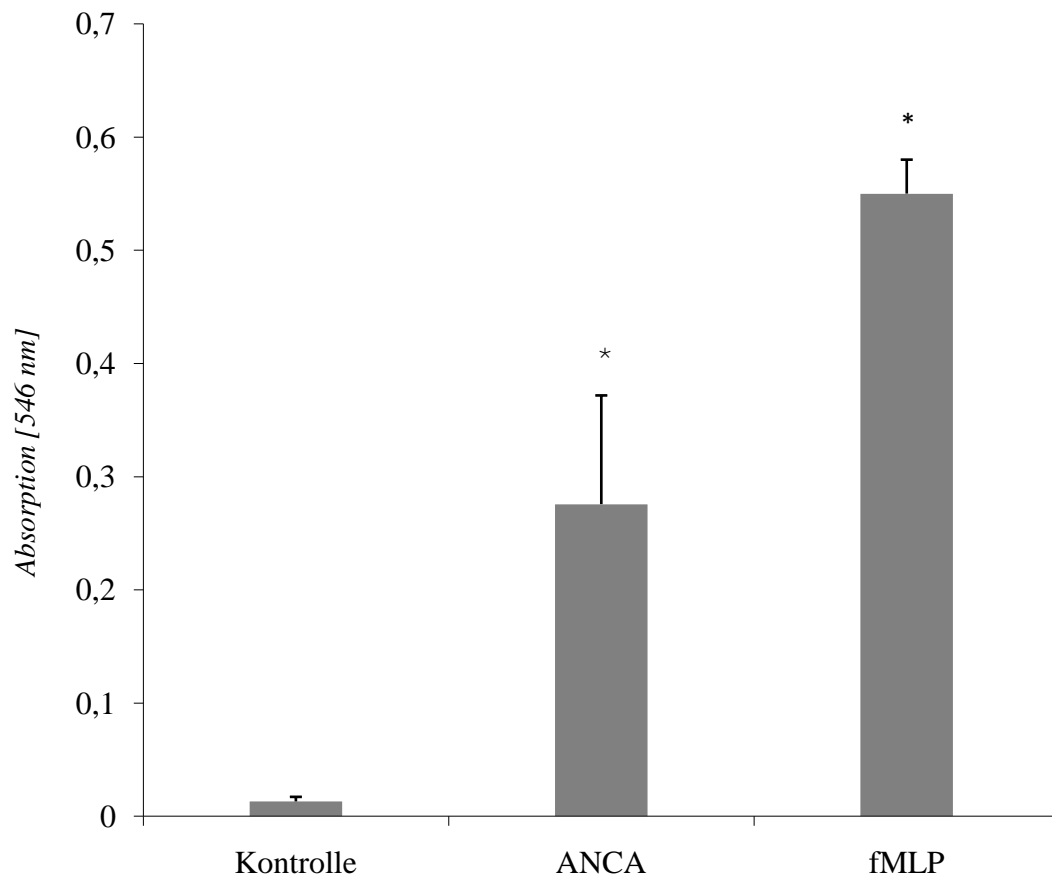


Abbildung 10:

ANCA (10µg/ml) induziert die Freisetzung von neutrophilen reaktiven Sauerstoffspezies. Es zeigte sich eine deutlich höhere Absorptionsrate (0,276 OD) derjenigen Proben, denen ANCA zugesetzt wurde, im Vergleich zu den Kontrollproben, denen nur aktivierte Granulozyten zugesetzt wurde (0,013 OD). Ebenso zeigten die Proben, die mit dem Standardstimulus fMLP aktivierte PMN enthielten, eine deutlich erhöhte Absorptionsrate (0,55 OD). Die Mittelwerte (+/- SEM) aus n=3 Experimenten sind dargestellt.

Die Absorptionsrate sowohl der mit ANCA als auch der mit dem Standardstimulus fMLP aktivierten Proben ist signifikant unterschiedlich zu den Kontrollproben ($p < 0,05$).

4.4 Makromolekülpermeabilität endothelialer Monolayer

4.4.1 Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC)

ANCA induzieren keinen wesentlichen Anstieg der Albumin-Permeabilität von HUVEC-Monolayern im Vergleich zu den Kontrollexperimenten.

Zunächst wurden Experimente an humanen Endothelzellen durchgeführt. Es wurde untersucht, wie sich die Interaktion von Anti-PR3-Antikörper, PMN und Endothelzellen auf die endotheliale Barrierenfunktion auswirkt. Ausdruck der Änderung der Integrität dieser Barriere ist die ansteigende oder abnehmende Albumin-Permeabilität endothelialer Monolayer, in diesem Fall Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC: „Human Umbilical Vein Endothelial Cell“). Die Endothelzellen bedecken eine Filtermembran, die das lumenale vom abluminalen Kompartiment eines Zweikammersystems trennt.

Die Messung der Albumin-Permeabilität erfolgte kontinuierlich über einen Zeitraum von 100 Minuten. Die Änderung der Permeabilität wird als Prozentsatz in Bezug auf die Kontrollexperimente angegeben, wobei die Kontrollen unbehandelte Endothelzellen darstellen. Sie entsprechen zu jedem Zeitpunkt einem Wert von 100%. In diesem und in den folgenden Experimenten werden die Kontrollen nicht in den Abbildungen dargestellt.

Nach der Zugabe von fMLP (1 μ M) zu TNF α (1ng/ml über 30 Minuten) stimulierten Granulozyten (2,5 x 10⁶/ml) in das lumenale Kompartiment ist ein schneller Anstieg der Albumin-Permeabilität zu beobachten. In der Minute 10-30 ist der Unterschied signifikant im Vergleich zu den Experimenten, die ausschließlich aktivierte Granulozyten enthalten. Nach 30 Minuten ist der Maximalwert von 140% erreicht und die Albuminpermeabilität fällt dann ebenso rasch innerhalb von 30 Minuten wieder auf einen Wert von 107,5%, um dann bis zum Ende des Experiments auf ähnlich niedrigem Niveau zu bleiben (Abb.11).

Die Konfrontation von TNF α -aktivierten PMN mit dem endothelialen Monolayer löst eine langsame, kontinuierliche Steigerung der Albumin-Permeabilität über den gesamten Beobachtungszeitraum aus. Nach 100 Minuten ist ein Anstieg auf 163,5% zu verzeichnen. Die Zugabe von ANCA (10 μ g/ml) zu aktivierten PMN löst ebenso eine kontinuierliche Erhöhung der Albumin-Permeabilität aus, allerdings ist der Anstieg der Albumin-Permeabilität im Vergleich zu den Kontrollen, die nur aktivierte PMN enthalten, nicht mehr steigerbar, sondern bleibt mit einem Niveau von 144,7% nach 100 Minuten geringer als die

durch aktivierte PMN induzierte Erhöhung der Albumin-Permeabilität. Es konnte hier kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Experimente, denen ANCA zugesetzt wurde, und den Experimenten, in denen ausschließlich aktivierte Granulozyten verwendet wurden, festgestellt werden.

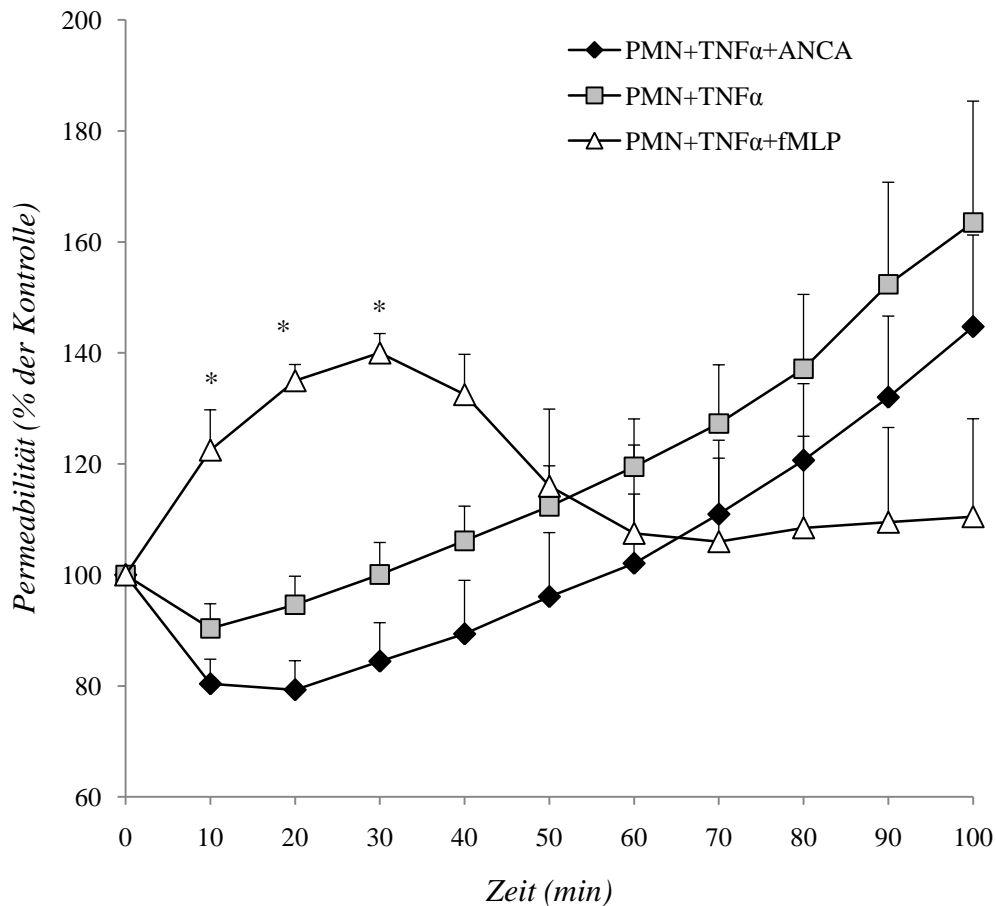


Abbildung 11:

Veränderung der Albumin-Permeabilität von HUVEC-Monolayern nach der Zugabe von ANCA (10 µg/ml) und fMLP (1µM) zu TNFα-aktivierten PMN. Dargestellt sind die Mittelwerte (+/-SEM) aus n=14 bzw. n=4 Experimenten mit unabhängigen Zellpräparationen.

PMN+TNFα+ANCA n=14; PMN+TNFα n=14 und PMN+TNFα+fMLP n=4.

Innerhalb des Zeitabschnitts 10-30 Minuten ist die Permeabilität der Experimente, denen fMLP zugesetzt wurde, signifikant unterschiedlich zu den Experimenten, in denen ausschließlich aktivierte Granulozyten eingesetzt wurden ($p < 0,05$). Der durch aktivierte PMN induzierte Anstieg der Albumin-Permeabilität ist durch die Zugabe von ANCA zu aktivierten Granulozyten nicht mehr steigerbar. Es gibt keinen signifikanten Unterschied der Albumin-Permeabilität im Vergleich der Experimente, in denen ANCA aktivierte Granulozyten eingesetzt wurden, und der Experimente, in denen ausschließlich aktivierte Granulozyten verwendet wurden.

4.4.2 Ratten-Koronar-Endothelzellen (RCEC)

Die Zugabe von ANCA zu aktivierten Granulozyten bewirkt einen moderaten, kontinuierlichen Anstieg der Albumin-Permeabilität von RCEC-Monolayern.

Da an makrovaskulären Endothelzellen keine deutliche endotheliale Permeabilitätssteigerung durch ANCA aktivierte Granulozyten auslösbar war, wurden mikrovaskuläre Endothelzellen verwendet.

In den folgenden Experimenten wurde die Albumin-Permeabilität endothelialer Ratten-Koronar-Endothelzell-Monolayer (RCEC: „Rat Coronary Endothelial Cell“) betrachtet. Neutrophile Granulozyten wurden in einer Konzentration von ($2,5 \times 10^6/\text{ml}$) eingesetzt. Die Messung der Albumin-Permeabilität erfolgte kontinuierlich über einen Zeitraum von 100 Minuten. Die Änderung der Permeabilität wird als Prozentsatz in Bezug auf die Kontrollexperimente (unbehandelte endotheliale Monolayer, nicht in Abbildungen gezeigt) angegeben.

Die Zugabe von fMLP ($1\mu\text{M}$) zu $\text{TNF}\alpha$ (1ng/ml über 30 Minuten) aktivierten Granulozyten bewirkte innerhalb von 10 Minuten einen raschen Anstieg der Permeabilität bis auf einen Maximalwert von 116,33%, der signifikant unterschiedlich ist zu Experimenten, in denen ausschließlich aktivierte Granulozyten oder mit ANCA aktivierte Granulozyten eingesetzt wurden. Danach kam es zu einem deutlichen Absinken bis auf 80,1% in der 90. Minute (Abb.12).

Die Konfrontation aktivierter Granulozyten mit ANCA ($10\mu\text{g/ml}$) bewirkte bis zu Minute 60 keine deutliche Änderung der Permeabilität. Danach findet ein moderater Anstieg bis auf 111,1% in der 100. Minute statt. Ab der 90. Minute ist die Veränderung signifikant unterschiedlich zu den Experimenten, in denen ausschließlich aktivierte Granulozyten verwendet wurden.

In Experimenten, denen ausschließlich aktivierte Granulozyten zugesetzt wurden, konnte bis zur 50. Minute eine kontinuierliche Abdichtung des endothelialen Monolayers beobachtet werden. Die Albumin-Permeabilität sank auf Werte bis 81,16%, um dann auf diesem Niveau zu verbleiben.

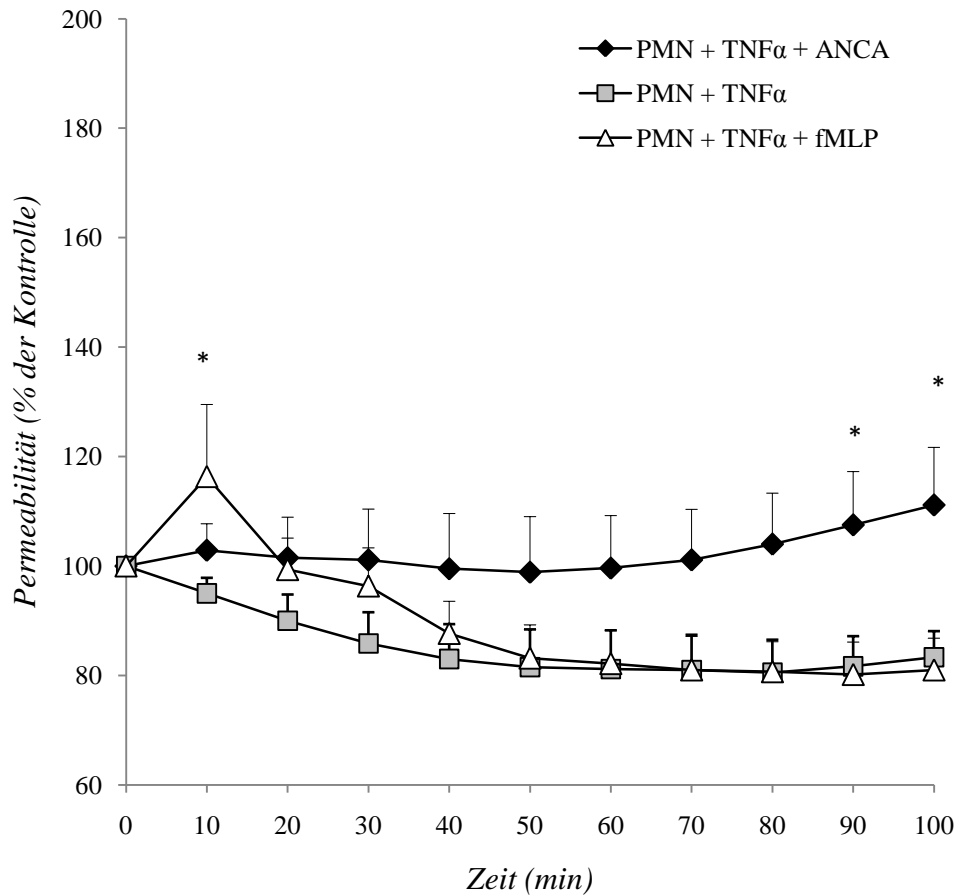


Abbildung 12:

Änderung der Albumin-Permeabilität von RCEC-Monolayern nach der Zugabe von ANCA (10 μ g/ml) und fMLP (1 μ M) zu „geprimten“ Granulozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte (+/- SEM) aus n=8 bzw. n=6 Experimenten mit unabhängigen Zellpräparationen.

PMN+TNF α +ANCA n=8; PMN+TNF α n=6; und PMN+TNF α +fMLP n=6.

Die Stimulation von aktivierten Granulozyten mit fMLP führt zu einem kurzfristigen Anstieg der Albumin-Permeabilität, in Minute 10 signifikant unterschiedlich zu Experimenten, die nur aktivierte Granulozyten enthielten ($p<0,05$). Ab der 90. Minute ist die Permeabilität in den Experimenten, in denen ANCA und aktivierte Granulozyten eingesetzt wurden, signifikant unterschiedlich im Vergleich zu Experimenten, in denen ausschließlich aktivierte Granulozyten verwendet wurden ($p<0,05$).

4.4.3 Ratten-Lungen-Endothelzellen (RLEC)

Die Konfrontation von ANCA und aktivierten Granulozyten mit Lungen-Endothelzell-Monolayern führt zu einer deutlichen Erhöhung der endothelialen Permeabilität.

Nachdem die Zugabe von ANCA zu aktivierten Granulozyten keinen signifikanten Effekt auf die Permeabilität von makrovaskulären Endothelzellen hatte und einen mäßigen Anstieg der Permeabilität bei mikrovaskulären Koronar-Endothelzellen bewirkte, wurde die ANCA-Wirkung auf die Permeabilität von mikrovaskulären Lungen-Endothelzellen (RLEC: „Rat Lung Endothelial Cell“) untersucht.

Die Albumin-Permeabilität wurde kontinuierlich über einen Zeitraum von 100 Minuten gemessen. Die Änderung der Permeabilität wird als Prozentsatz in Bezug auf die Kontrollexperimente (unbehandelte endotheliale Monolayer, nicht in Abbildungen gezeigt) angegeben. In allen Experimenten wurden mit TNF α (1ng/ml über 30 Minuten) voraktivierte Granulozyten ($2,5 \times 10^6$ /ml) verwendet.

Bei den Experimenten, die nur „geprimte“ PNM enthielten, ließ sich kaum eine Änderung der Permeabilität verzeichnen. Sie blieb auf einem niedrigen Niveau im Bereich von 100 bis 110,51%. Es zeigte sich, dass fMLP einen raschen und deutlichen Anstieg der Permeabilität induziert, in Minute 10-40 signifikant unterschiedlich zu den Experimenten, die ausschließlich aktivierte Granulozyten enthielten. Innerhalb der ersten 20 Minuten auf einen Wert von 160,53% ansteigend, im weiteren Verlauf dann kontinuierlich bis auf 115,92% abfallend.

Die Zugabe von ANCA zu „geprimten“ PMN bewirkt eine stetige Zunahme der Albumin-Permeabilität über den gesamten Beobachtungszeitraum bis zu einem Maximalwert von 168,83% in der 100. Minute, ab Minute 50 signifikant unterschiedlich zu Experimenten, denen nur aktivierte Granulozyten zugesetzt waren (Abb.13).

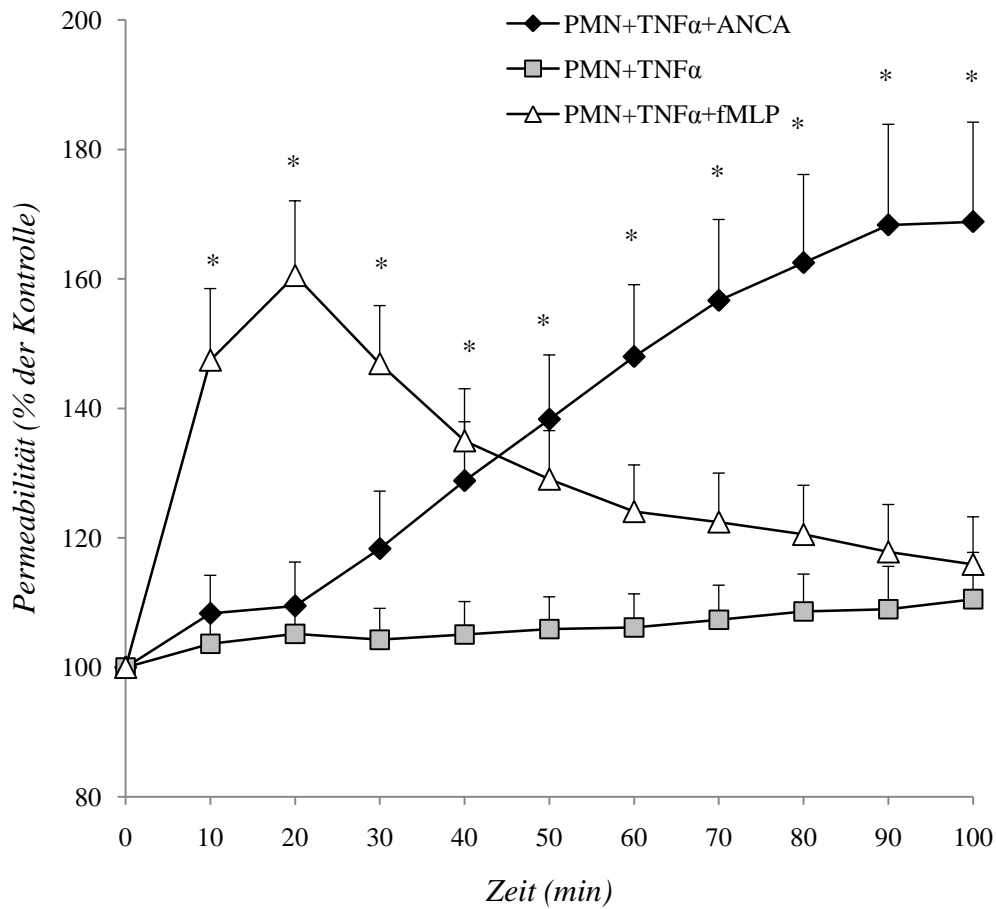


Abbildung 13:

Änderung der Albumin-Permeabilität von RLEC-Monolayern nach Zugabe von ANCA (10 μ g/ml) bzw. fMLP (1 μ M) zu „geprimten“ Granulozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte (+/- SEM) aus n=6, n=11, n=13 Experimenten mit unabhängigen Zellpräparationen. PMN+TNF α +ANCA n=6 PMN+TNF α n=11 und PMN+TNF α +fMLP n=13.

Experimente, in denen ANCA aktivierte Granulozyten eingesetzt wurden, zeigten einen deutlichen, kontinuierlichen Anstieg der Albumin-Permeabilität. Signifikant unterschiedlich im Vergleich zu Experimenten, denen nur aktivierte Granulozyten zugesetzt wurden, ab Minute 50 ($p < 0,05$, ab Minute 60 $p < 0,01$). In Experimenten, die fMLP aktivierte Granulozyten enthielten, ist der rasche Permeabilitätsanstieg zu Beginn des Experimentes signifikant unterschiedlich in Minute 10-40 ($p < 0,05$).

4.4.4 Isotyp Kontroll-Antikörper: Einfluss auf Permeabilität von RLEC-Monolayern

Isotyp Kontroll-Antikörper der IgG-Klasse verursachen nach Zugabe zu aktivierten Granulozyten keinen Anstieg der Permeabilität von RLEC-Monolayern.

Da die pulmonalen Endothelzellen die ausgeprägteste Permeabilisierung durch ANCA aktivierte Granulozyten aufwiesen, wurden die nachfolgenden Experimente mit diesem Zelltyp durchgeführt. Mit dem Einsatz des Isotyp Kontroll-Antikörpers MOPC-21 sollte die unspezifische Wirkung von Antikörpern der IgG-Klasse bei der Entstehung der endothelialen Funktionsstörung ausgeschlossen werden.

In jedem Experiment wurden mit $\text{TNF}\alpha$ (1ng/ml über 30 Minuten) voraktivierte Granulozyten ($2,5 \times 10^6/\text{ml}$) eingesetzt. Die Änderung der Albumin-Permeabilität wird wiederum als Prozentsatz in Bezug auf die Kontrollexperimente angegeben (unbehandelte endotheliale Monolayer, nicht in Abbildungen gezeigt). Die Zugabe des MOPC 21-Antikörpers (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und ANCA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) erfolgte zeitgleich, für weitere 100 Minuten fand die Messung der Permeabilität statt.

Experimente, denen ANCA zugesetzt war, zeigten eine deutliche Erhöhung der Permeabilität, im Zeitverlauf kontinuierlich ansteigend bis auf Werte von 168,83%. Die Konfrontation der aktivierten PMN mit dem Antikörper MOPC-21 führte über den gesamten Zeitraum nicht zu einer nennenswerten Erhöhung der Permeabilität, sondern blieb signifikant unterschiedlich zu den Experimenten, in denen ANCA aktivierte Granulozyten verwendet wurden, im Bereich von 118% in Minute 60 bzw. 108% in Minute 100 (Abb.14).

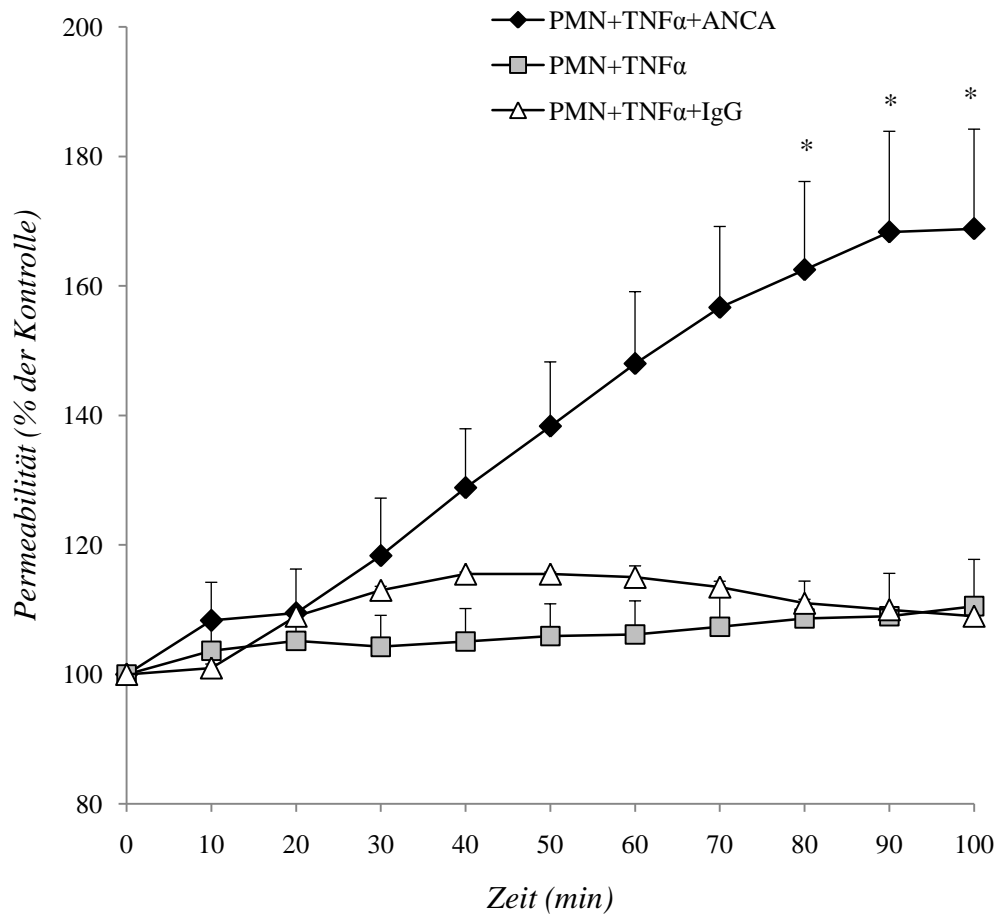


Abbildung 14:

Vergleich der Effekte des Isotyp Kontroll-Antikörpers MOPC-21 (IgG_c) ($10\mu\text{g/ml}$) und ANCA ($10\mu\text{g/ml}$) auf die Granulozyten vermittelte Änderung der Albumin-Permeabilität von RLEC-Monolayern. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) aus $n=6$, $n=11$, $n=4$ Experimenten mit unabhängigen Zellpräparationen.

$\text{PMN}+\text{TNF}\alpha+\text{ANCA}$ $n=6$; $\text{PMN}+\text{TNF}\alpha$ $n=11$; und $\text{PMN}+\text{TNF}\alpha+\text{IgG}_c$ $n=4$.

Zu den Zeitpunkten zwischen Minute 80 und 100 ist die Permeabilität in Experimenten, in denen ANCA bzw. MOPC-21 zugesetzt wurde, signifikant unterschiedlich ($p<0,05$).

4.4.5 Blockade des endothelialen ICAM-1-Rezeptors: Einfluss auf die Permeabilität von RLEC-Monolayern

Nach einer Blockade des endothelialen ICAM-1 Rezeptors lässt sich durch die Zugabe von ANCA zu aktivierten Granulozyten der Anstieg der Permeabilität von RLEC-Monolayern verhindern.

Bei der Adhäsion der Granulozyten am Endothel ist der endotheliale ICAM-1 Rezeptor von entscheidender Bedeutung. Um eine Blockade dieses Rezeptors und eine Hemmung der PMN Adhäsion zu erreichen, wurden RLEC-Monolayer vor Versuchsbeginn 2 Stunden mit einem Anti-ICAM-1-Antikörper (2µg/ml) inkubiert, wobei ein funktionsblockierender, monoklonaler Maus-anti-Ratte Ak eingesetzt wurde.

Wie in allen vorherigen Experimenten befanden sich auch hier mit TNFα (1ng/ml über 30 Minuten) aktivierte Granulozyten ($2,5 \times 10^6$ /ml) im luminalen Kompartiment. Die Änderung der Albumin-Permeabilität wird als Prozentsatz in Bezug auf die Kontrollexperimente angegeben (unbehandelte endotheliale Monolayer, nicht in Abbildungen gezeigt). Die Messung der Permeabilitätsänderung erfolgte über 100 Minuten.

Auch hier kommt es nach Konfrontation der „geprimten“ Granulozyten mit ANCA zu einer deutlichen Erhöhung der Permeabilität, entsprechend einem Maximalwert von 168,83%. Im Gegensatz dazu lässt sich bei den mit Anti-ICAM-1-Antikörpern inkubierten Monolayern kein Anstieg der Albumin-Permeabilität durch ANCA induzieren. Die Albumin-Permeabilität stagniert auf niedrigem Niveau mit Werten von 94,4-100%. Ab der 40. Minute ist die Permeabilität signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Experimenten, in denen ANCA aktivierte Granulozyten verwendet wurden (Abb.15).

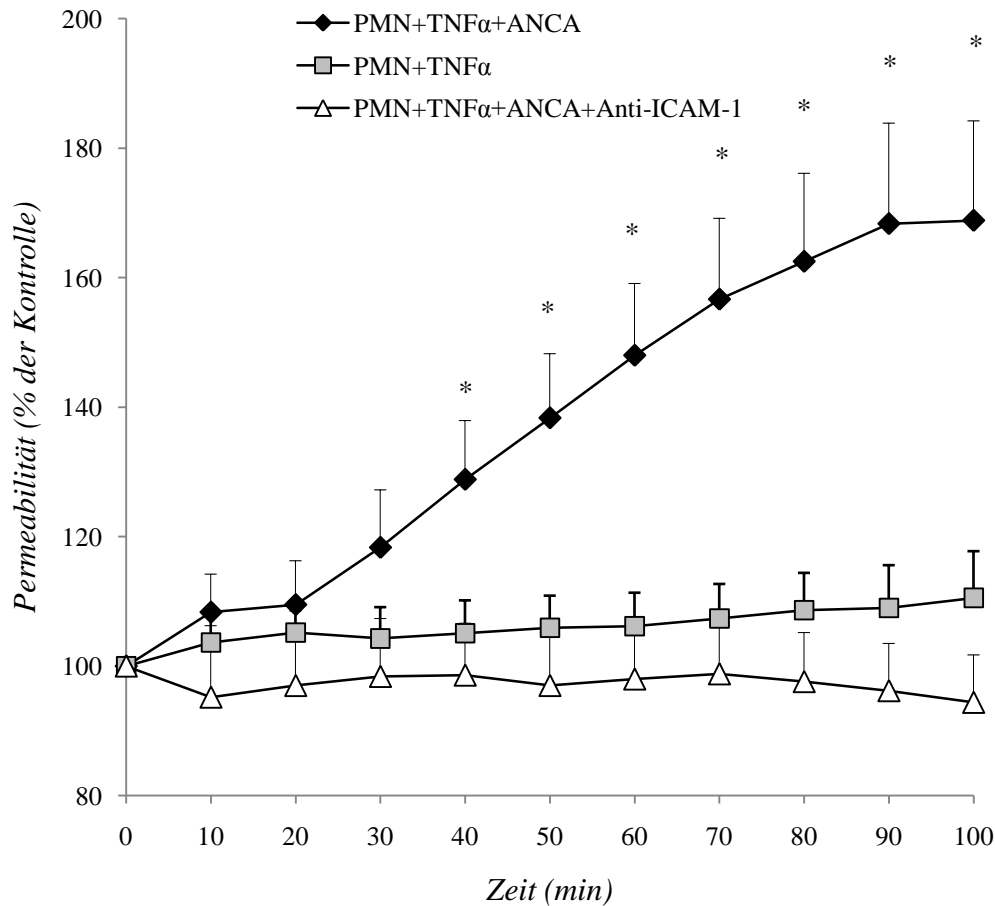


Abbildung 15:

Hemmung der ANCA (10µg/ml) Wirkung auf die Albumin-Permeabilität von RLEC-Monolayern durch den Einsatz von Anti-ICAM-1 Antikörpern (2µg/ml). Dargestellt sind die Mittelwerte (+/- SEM) aus n=6, n=11, n= 5 Experimenten mit unabhängigen Zellpräparationen.

PMN+TNFα+ANCA n=6; PMN+TNFα n=11; und PMN+TNFα+ANCA+Anti-ICAM-1 n=5. Ab der 40. Minute ist die Permeabilität der Experimente, in denen der Anti-ICAM-1 Antikörper eingesetzt wurde, signifikant unterschiedlich zu Experimenten, in denen der ICAM-1 Rezeptor nicht blockiert wurde (p<0,05).

4.4.6 Hemmung granulozytärer Reaktionsprodukte: Einfluss auf die Permeabilität von RLEC-Monolayern

Eine Neutralisation bzw. Synthesehemmung der neutrophilen Reaktionsprodukte verhindert einen Anstieg der Permeabilität von RLEC-Monolayern nach der Zugabe von ANCA zu aktivierten Granulozyten.

ANCA induzieren bei aktivierten Granulozyten den „respiratory burst“ mit der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies. Im folgenden Experiment wurde untersucht, inwieweit eine Hemmung dieser granulozytären Reaktionsprodukte Einfluss auf die durch ANCA ausgelöste Permeabilitätsänderung von RLEC-Monolayern hat. Durch den Einsatz von DPI (5 µg/ml) wird eine Hemmung der NADPH-Oxidase erreicht, mit Hilfe der SOD (300 U/ml) werden entstandene Sauerstoffspezies weiter metabolisiert.

Die Albumin-Permeabilität wurde kontinuierlich über einen Zeitraum von 100 Minuten gemessen. Die Änderung der Permeabilität wird als Prozentsatz in Bezug auf die Kontrollexperimente angegeben (unbehandelte endotheliale Monolayer, nicht in Abbildungen gezeigt). In allen Experimenten fanden sich mit TNFα (1ng/ml über 30 Minuten) aktivierte Granulozyten ($2,5 \times 10^6$ /ml). Die Zugabe der oben genannten Pharmaka und ANCA (10 µg/ml) erfolgte zeitgleich.

Es zeigte sich deutlich, dass es in den Experimenten, in denen SOD oder DPI eingesetzt wurde, nicht zu einem Anstieg der Albumin-Permeabilität kommt, sie verbleibt niedrig, in der 100. Minute wurde in den Experimenten mit SOD eine Permeabilität von 89% gemessen, in den Experimenten mit DPI 100%. In beiden Fällen ist der Unterschied signifikant zu Experimenten, die ausschließlich ANCA aktivierte Granulozyten enthielten (Abb.16).

Die Konfrontation von ANCA und aktivierten Granulozyten löst dagegen eine deutliche Permeabilitätssteigerung aus (168,83%).

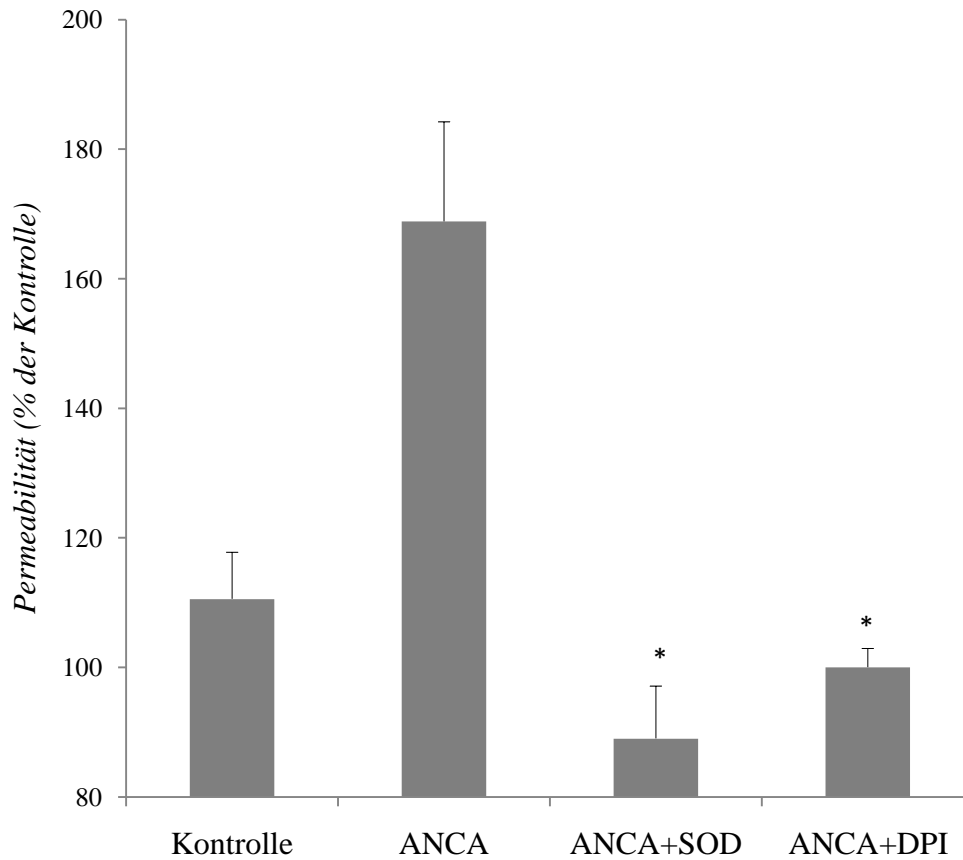


Abbildung 16:

Der Einsatz von SOD (300 U/ml) und DPI (5 µg/ml) führt zu einer Hemmung des durch ANCA (10 µg/ml) ausgelösten Anstiegs der Albumin-Permeabilität von RLEC-Monolayern. Dargestellt sind die Mittelwerte (+/- SEM) aus n=11, n=6, n=4 Experimenten unabhängiger Zellpräparationen.

Kontrolle: (PMN+TNFα) n=11; ANCA: (PMN+TNFα+ANCA) n=6; ANCA+SOD: (PMN+TNFα+ANCA+SOD) n=4 und ANCA+DPI: (PMN+TNFα+ANCA+DPI) n=4.

Signifikant unterschiedlich ist die Permeabilität in Minute 100 in den Experimenten, in denen SOD ($P < 0,01$) bzw. DPI ($P < 0,05$) eingesetzt wurde, im Vergleich zu den Experimenten, in denen ausschließlich ANCA aktivierte Granulozyten verwendet wurden.

5. Diskussion

5.1 Entwicklung der Fragestellung

Die Pathogenese der Wegener'schen Granulomatose ist bis heute nicht vollständig geklärt. Charakteristisches Merkmal der Erkrankung ist eine fibrinoid endotheliale Nekrose mit perivaskulärer Leukozyteninfiltration und Granulombildung (124). Im Krankheitsverlauf der WG ist die Lunge das am häufigsten betroffene Organ. Unter Umständen kann bei fulminanten Verlaufsformen ein akutes Lungenversagen mit Ödembildung und respiratorischer Insuffizienz manifest werden (5). Neben einer Schädigung der Lunge kann es aufgrund einer rapid-progressiven Glomerulonephritis (RPGN) zudem zu einer Schädigung der Nieren kommen, man spricht dann vom „pulmo-renalen Syndrom“ (24).

Erstmals 1982 beschrieben, wurden die Anti-neutrophilen zytoplasmatischen Auto-Antikörper (ANCA) bald als diagnostischer Marker etabliert (14, 15). *In-vitro* konnte gezeigt werden, dass ANCA neutrophile Granulozyten aktivieren, was zu einer Freisetzung von reaktiven Sauerstoffverbindungen und granulozytären Proteasen führt und eine pathogenetische Bedeutung der Antikörper bei der Entstehung der AASV vermuten lässt (125, 112, 126). Voraussetzung für die Interaktion von ANCA und Granulozyt scheint die Translokation des Zielantigens Proteinase 3 (PR3) an die Membranoberfläche, *in-vitro* durch Voraktivierung („priming“) der Granulozyten mit pro-inflammatorischen Zytokinen erreicht (127).

Theoretischer Hintergrund der vorliegenden Arbeit ist die Annahme, dass die klinischen Veränderungen der Lungenfunktion auf einer Störung der endothelialen Integrität basieren, resultierend aus der ANCA induzierten Aktivierung von Granulozyten mit neutrophiler Degranulierung, Sekretion reaktiver Sauerstoffspezies und daraus folgender Beeinträchtigung der endothelialen Barrierenfunktion.

Im Rahmen von Permeabilitätsmessungen endothelialer Zellmonolayer sollten nun die Auswirkungen der Interaktion von ANCA, Granulozyt und Endothelzelle auf die Barrierenfunktion verschiedener Endothelzellmonolayer untersucht werden, sowie die Möglichkeiten einer pharmakologischen Intervention in das Geschehen getestet werden.

5.2 Die Membranexpression von Proteinase 3 auf neutrophilen Granulozyten ist aktivierungsabhängig

Das Hauptantigen von ANCA bei Patienten mit WG ist die PR3 (128–130). PR3 wird intrazellulär in neutrophilen Granula gespeichert und nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Mediatoren auf die Membranoberfläche transloziert oder an die Umgebung abgegeben. Die Translokation ist Voraussetzung für die Interaktion von ANCA mit neutrophilen Granulozyten (127). Man nennt diesen Vorgang „priming“.

Der Anteil an ruhenden Granulozyten, die PR3 membranständig exprimieren, ist genetisch determiniert, dabei stellt ein hoher Anteil an konstitutiv exprimierter, membranöser PR3 (mPR3) auf PMN einen Risikofaktor für die Entstehung der AASV dar (131, 132). Auch zeigten Patienten mit WG und einem erhöhten Prozentsatz an mPR3 positiven PMN eine erhöhte Rückfallrate (133, 134). In Vorversuchen wurden zunächst die experimentellen Bedingungen festgelegt, unter denen die Membranexpression von PR3 auf humanen neutrophilen Granulozyten gelingt. Dazu wurde durchflußzytometrisch die Oberflächenexpression von PR3 auf TNF α aktivierten PMN bestimmt. Als optimal stellte sich eine Vorinkubation der PMN mit TNF α (1ng/ml) über 30 Minuten heraus, wohingegen PMN, die nicht oder mit höheren Konzentrationen TNF α behandelt wurden, das Zielantigen kaum exprimierten (Abb.9). Die Ursache für die fehlende Expression in nicht aktivierten PMN könnte in der intragranulären Retention der Protease liegen, bei überstimulierten PMN kann es zum Abwerfen, „shedding“, des Moleküls und der Freisetzung in den Zellüberstand kommen.

5.3 Anti-PR3-Antikörper aktivieren neutrophile Granulozyten in-vitro

Die Aktivierung neutrophiler Granulozyten durch ANCA mit daraus folgender Degranulierung und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, „respiratory burst“, scheint ein wichtiger Mechanismus bei der Entstehung der AASV zu sein (8). Aktivierte, „geprimte“, humane neutrophile Granulozyten wurden über einen Zeitraum von 10 Minuten mit dem Anti-PR3-Antikörper konfrontiert. Die Interaktion resultierte in einer deutlichen Superoxidproduktion der ANCA-stimulierten Granulozyten (Abb.10). Es zeigte sich, dass Anti-PR3-Antikörper *in-vitro* nach Interaktion mit neutrophilen Granulozyten den sogenannten „respiratory burst“ mit der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

auslösen können. Der schon in mehreren Arbeiten beschriebene Effekt konnte hier reproduziert werden (8, 114, 126).

5.4 Heterogenität des vaskulären Endothels: unterschiedliches Reaktionsmuster auf die Interaktion mit ANCA stimulierten Granulozyten

In Zusammenhang mit der Krankheitsentstehung der ANCA-assoziierten-systemischen Vaskulitiden ist das Gefäßendothel das letztendlich geschädigte Organ, wobei nicht das Endothel, sondern neutrophile PMN die direkten Zielzellen für ANCA darstellen (81). Die Interaktion von ANCA mit den Endothelzellen wird widersprüchlich beschrieben (135). In einem Zweikammer-System wurde die Wirkung von ANCA aktivierten PMN auf verschiedene Endothelzell-Monolayer untersucht. Ausdruck der endothelialen Integrität ist in diesem Modell die Albuminpermeabilität des Monolayers (123).

5.4.1 makrovaskuläres Endothel: HUVEC

Endotheliale Barrierenfunktion: fehlende Reaktion von HUVEC auf die Interaktion mit ANCA stimulierten Granulozyten

Mit der Verwendung eines HUVEC-Monolayers und humanen neutrophilen Granulozyten war die Versuchsdurchführung in einem rein humanen System möglich. Granulozyten, aktiviert mit dem bakteriellen Tripeptid fMLP, einem potenten Stimulus des neutrophilen „respiratory burst“, wurden als Positivkontrolle eingesetzt, ausschließlich mit TNF α stimulierte PMN als Negativkontrolle.

FMLP aktivierte Granulozyten induzieren eine rasche Antwort des Endothels. Es kommt zu einem vorübergehenden, deutlichen Anstieg der Albumin-Permeabilität mit einem Maximum in der 30. Minute. Auch TNF α aktivierte PMN lösen eine kontinuierliche Steigerung der Permeabilität aus, mit einem Maximalwert in der 100. Minute, allerdings ist dieser Effekt durch die Zugabe von ANCA nicht mehr steigerbar (Abb.11). Eine Modifikation der endothelialen Barriere nach direkter Interaktion von ANCA mit dem Endothel, die bereits beschrieben wurde (135), war hier nicht zu erwarten, da das Zielantigen PR3 auf Endothelzellen nur nach vorheriger Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen auf der Oberfläche exprimiert wird (136).

Auf HUVEC adhärente PMN setzen nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ reaktive Sauerstoffspezies (H_2O_2) frei, wobei eine Ruheperiode von 5-90 Minuten nach Stimulation zu beobachten ist. Im Vergleich zur Sekretion fMLP aktivierter Granulozyten ist der Anstieg der ROS Sekretion $\text{TNF}\alpha$ aktivierter PMN kontinuierlich und weniger steil sowie in der Maximalmenge etwas geringer (137).

Diese unterschiedliche Kinetik der ROS-Sekretion könnte dem divergierenden Zeitverlauf der durch $\text{TNF}\alpha$ - und fMLP-aktivierten PMN ausgelösten Veränderung der Barrierenfunktion der HUVEC-Monolayer zugrunde liegen. Die quantitativen Veränderungen der PMN vermittelten Permeabilität im oben beschriebenen Zweikammer-System könnten auf die Freisetzung von ROS zurückzuführen sein und schon $\text{TNF}\alpha$ aktivierte PMN eine so starke Modifikation der endothelialen Barriere auslösen, dass durch die Zugabe von ANCA kein meßbarer Effekt ausgelöst werden konnte.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ergebnissen, konnte in einem anderen Modell die schädigende Wirkung von ANCA aktivierten Granulozyten auf HUVEC nachgewiesen werden. So zeigte sich nach Kokultur von Anti-PR3-Antikörpern aktivierten PMN und HUVEC eine verstärkte Freisetzung von $^{111}\text{Indium}$ (als einem Marker für die zytotoxische Schädigung der Endothelzelle) im Vergleich zu den Kontrollen (138).

Diese divergierenden Ergebnisse der beiden Untersuchungen könnten unter anderem auf den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen der genannten Veröffentlichung basieren. So wurde ein anderer Anti-PR3-Antikörper mit vermutlich abweichender Epitop-Spezifität verwendet, zudem ist fraglich, ob eine $^{111}\text{Indium}$ -Freisetzung als Marker einer unspezifischen endothelialen Schädigung tatsächlich auch die komplexen Vorgänge einer Veränderung der endothelialen Barriere nach sich zieht.

In einem Permeabilitäts-Modell zur Untersuchung des Sepsis induzierten Akuten-Lungen-Versagens (ALI) scheinen HUVEC aufgrund des unterschiedlichen Reaktionsmusters im Vergleich zu „human-pulmonary-microvascular-endothelial-cells“ (HPMVEC) keine geeigneten Endothelzellen zur Untersuchung der Pathogenese zu sein (139). Ebenso zeigte sich, dass das Adhäsionsverhalten von PMN an aktiviertem Endothel im Vergleich von HPMVEC und HUVEC deutliche Unterschiede aufweist und die Adhäsion an mikrovaskulärem Endothel deutlich stärker ist (140).

Bei Berücksichtigung der klinischen Symptome der WG, die vor allem die mittleren und kleinen Gefäße betreffen, mag die Verwendung von makrovaskulärem Endothel in diesem Modell ungeeignet sein.

5.4.2 mikrovaskuläres Endothel: RCEC

Endotheliale Barrierenfunktion: fehlende Reaktion von RCEC auf die Interaktion mit ANCA stimulierten Granulozyten

An HUVEC-Monolayern lösten ANCA aktivierte Granulozyten keine im Vergleich zu den Kontrollexperimenten unterschiedliche Modifikation der endothelialen Barriere aus. Für weitere Experimente wurden mikrovaskuläre Endothelzellen aus den Koronargefäßen sowie den Lungengefäßen der Ratte verwendet.

Trotz fast identischer Nukleotid- und Proteinsequenz von humaner und muriner PR3 (murin: Familie Muridae, Subfamilie Murinae: „Alte-Welt Ratten und Mäuse“ 141) binden humane c-ANCA nicht an murine PR3, d.h. Epitope auf muriner PR3 werden nicht erkannt (142). Deshalb ist die Verwendung von muriner PMN für den folgenden Versuchsansatz ungeeignet. Humane Granulozyten zeigen in der Interaktion mit Rattengewebe bezüglich Adhäsion und Migration ein physiologisches Verhalten (143). Somit konnte mit der Verwendung humaner Granulozyten und rekombinanter Anti-PR3-Antikörper sowie muriner Endothelzellen ein *in-vitro* Modell erstellt werden, in dem die Bedeutung der Interaktion von ANCA-PMN-Endothelzelle für die Pathogenese der AASV näher untersucht werden konnte.

RCEC reagieren kaum auf die Interaktion mit aktivierten Granulozyten. So induzieren fMLP-aktivierte PMN einen kurzfristigen und moderaten Anstieg der Albuminpermeabilität auf einen Maximalwert von 116,33 % in der 10. Minute. Nach weiteren 10 Minuten ist bereits wieder das Ausgangsniveau erreicht. Auch ANCA aktivierte Granulozyten induzieren lediglich einen sehr geringen, kontinuierlichen Anstieg der Albuminpermeabilität. Nach 100 Minuten wird ein Wert von 111,1% erreicht (Abb.12). Koronarendothelzellen scheinen wenig empfänglich für die von aktivierten Granulozyten freigesetzten Metaboliten.

In Zusammenhang mit der WG ist eine klinische Beteiligung des Herzens ungewöhnlich, nur wenige Fälle sind beschrieben, in denen histologisch kardiale Läsionen nachgewiesen wurden (144, 145). Dagegen ist beim CSS die Myokarditis und Entzündung der Koronargefäße für 50% der Todesfälle bei unbehandelter oder unerkannter Krankheit verantwortlich (145, 29). Dieser Erkrankung liegt ein zur WG unterschiedlicher Pathomechanismus zugrunde. Auch führen Entzündungen im Bereich der Koronararterien in der Regel zu ischämisch/thrombotischer klinischer Symptomatik, weniger zur Ausprägung eines Ödems im Bereich der Koronararterien (146).

5.4.3 mikrovaskuläres Endothel: RLEC

Modifikation der endothelialen Barriere des RLEC-Monolayer nach Interaktion mit ANCA stimulierten Granulozyten

Die AASV sind durch eine Schädigung des Endothels gekennzeichnet. Frühe Veränderungen zeigen sich als Schwellung und Ablösung der Endothelzellen von der Basalmembran (83).

RLEC reagieren sensibel auf die Interaktion mit ANCA oder fMLP aktivierten Granulozyten. Ähnlich wie bei HUVEC-Monolayern lösen fMLP aktivierte PMN einen raschen und vorübergehenden Anstieg der Albumin-Permeabilität mit einem Maximalwert in der 30. Minute aus. Auch ANCA aktivierte PMN modifizieren die endotheliale Barriere. Sie induzieren eine im Vergleich mit fMLP aktivierten Granulozyten, langsamere und kontinuierliche, aber ebenso deutliche Steigerung der Permeabilität mit einem Maximum ab der 90. Minute. Ausschließlich mit TNF α aktivierte PMN lösen kaum eine Veränderung aus (Abb.13). Bei Patienten mit WG kommt es zu Entzündungen der kleinen und mittleren Gefäße v.a. in der Lunge und in der Niere. So sind die Lungen bei 90% der Patienten betroffen, bei 5% kommt es zu fulminanten Verlaufsformen mit künstlicher Beatmung, 7-45% entwickeln eine DAH (diffuse alveoläre Hämorrhagie) (5). Mit der Verwendung mikrovaskulärer Endothelzellen aus der Lunge der Ratte werden Endothelzellen entsprechend der Gefäßabschnitte verwendet, an denen sich die klinischen Veränderungen im humanen Patienten zeigen.

In einem ex-vivo-Ratten-Lungen-Modell konnte nach Perfusion mit ANCA aktivierten neutrophilen Granulozyten die Ödembildung mit Gewichtszunahme der Lunge und Anstieg des kapillären Filtrationskoeffizienten (KfC), als einem Marker für eine verstärkte endotheliale Permeabilität, induziert werden. Da der pulmonalarterielle Druck nicht verändert war, kann von einer primären Störung der endothelialen Barrierenfunktion ausgegangen werden (147).

Zur Untersuchung der Transportmechanismen in Zusammenhang mit der PMN vermittelten pulmonalen Hyperpermeabilität und Ödembildung konnte an isolierten Rattenlungen und an mikrovaskulärem Lungenendothel („rat lung microvascular endothelial cells“, RLMVECs) gezeigt werden, dass fMLP aktivierte neutrophile Granulozyten einen Anstieg der transzytotischen endothelialen Transportrate von Albumin mit nachfolgender Ödembildung induzieren (70).

Auch bei anderen systemischen Erkrankungen finden sich aktivierte neutrophile Granulozyten und im Krankheitsverlauf ist häufig die Lunge ein betroffenes Organ. So können Endotoxine, systemische mikrobielle Infektionen oder im Rahmen von Transfusionen zirkulierende Anti-neutrophile Allo-Antikörper, PMN vermittelt, zu akutem Lungenversagen mit respiratorischer Insuffizienz und Ödembildung führen (148, 75).

Neben den *in-vitro* Daten, die die pathogenetische Bedeutung von ANCA vermuten lassen, gibt es bisher noch keine überzeugenden *in-vivo* Modelle, die eine Untersuchung der Pathogenese der WG erlauben (6). So konnte nach systemischer Injektion von Anti-Maus-PR3-Antikörpern immunisierter Mäuse keine Vaskulitis oder Glomerulonephritis ausgelöst werden. Nach zusätzlicher lokaler Injektion von TNF α zeigte sich jedoch eine lokale Reaktion in Form einer subkutanen Pannikulitis (149).

Sowohl funktionale als auch morphologische Heterogenität ist eine Kerneigenschaft von Endothelzellen. Jedes Gefäßbett zeichnet sich durch spezifische strukturelle und funktionale Eigenschaften aus (150), unter anderem durch die unterschiedliche Empfindlichkeit auf Entzündungsreize zu reagieren. Das Endothel kann in diesem Zusammenhang pro-inflammatorische Funktion haben und mit den neutrophilen Mediatoren interagieren und so die schädigende Wirkung unterstützen, ebenso kann es die schädigende Wirkung der neutrophilen toxischen Faktoren neutralisieren (151), so kann die neutrophile Antwort z.B über die endotheliale Freisetzung von Endothelin vermindert werden (81).

Mikrovaskuläres Endothel der Lunge reagiert deutlich empfindlicher auf die Konfrontation mit aktivierten Granulozyten als das Endothel der großen Lungengefäße (152).

Die charakteristischen Eigenschaften des Endothels können eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Reaktionsmuster der verschiedenen Endothelzellmonolayer auf die Interaktion mit aktivierten Granulozyten sein, in Zusammenhang mit dem klinischen Bild der WG kann dies zudem eine Ursache sein für die hauptsächliche Lokalisation der Veränderungen in bestimmten Gefäßabschnitten.

In diesem Rahmen könnte auch die Untersuchung der Interaktion von ANCA, PMN und Endothel der Niere, einem häufig betroffenen Organ bei Patienten mit WG, von Interesse sein.

5.5 Mechanismen, die zur ANCA induzierten, PMN vermittelten Modifikation der endothelialen Barriere führen

Mögliche Mechanismen, über die ANCA aktivierte Granulozyten die endotheliale Integrität modifizieren, werden nachfolgend diskutiert.

5.5.1 Anti-PR3-Antikörper binden spezifisch an neutrophile Granulozyten

Anti-PR3-Antikörper aktivierte neutrophile Granulozyten induzieren im vorliegenden Modell eine Schädigung des Endothels. Die Interaktion der so aktivierten PMN mit dem Endothel bewirkt eine deutliche Steigerung der endothelialen Permeabilität. Dieser Effekt konnte mit der Verwendung eines IgG Isotyp Kontroll-Antikörper nicht reproduziert werden (Abb.14). Damit konnte gezeigt werden, dass der permeabilitätssteigernde Effekt spezifisch durch den Anti-PR3-Antikörper ausgelöst wird.

Es wurde bereits beschrieben, dass für die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten durch ANCA und die Auslösung des „respiratory burst“ und Degranulierung, die Antigen-Bindung über das F(ab')₂ („fraction-antigen-binding“)-Fragment sowie die Anlagerung des Fc-Fragmentes an den neutrophilen Fc-γ-Rezeptor-IIa (CD16) notwendig ist (153, 154). Jeder Mechanismus aktiviert hierbei einen anderen intrazellulären Signalweg (155).

So führt die gleichzeitige Bindung von ANCA an PR3 und den Fc-γ-Rezeptor-IIa zur Aktivierung der p101/p110γ-Isoformen der PI3-Kinase (Phosphatidylinositol-3-Kinase) und der Aktivierung der PKB (Protein Kinase B)/Akt sowie der ERK (extracellular signal-regulated kinase). Die Aktivierung von Fc-γ-Rezeptor-IIa durch ANCA-PR3-Immunkomplexe induziert die Signaltransduktion über eine p85/p110 PI3-K und PLD (Phospholipase D) abhängigen Weg. Nachfolgend kommt es zur Aktivierung der NADPH-Oxidase und zur Auslösung des „respiratory burst“ (8).

Die durch ANCA aktivierten Signalwege in den Granulozyten scheinen unterschiedlich zu denen, welche an der konventionellen Immun-Komplex vermittelten Aktivierung von neutrophilen Granulozyten beteiligt sind (155, 114). Hier könnten sich eventuelle therapeutische Interventionsmöglichkeiten bieten, ohne eine Beeinträchtigung der vollständigen Immunantwort. Der Einsatz der Auto-Antikörper in Serum- und damit komplementfreiem Medium in den aktuellen Versuchsansätzen weist auf den Ausschluss einer komplementabhängigen Entzündungsreaktion hin, entspricht somit dem Pauci-

Immuncharakter der WG mit fehlenden Immunkomplexablagerungen (38). Bei Patienten mit MPO-ANCA positiver AASV gibt es Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der alternativen Komplement-Aktivierung, auch wurden glomeruläre Immunkomplexablagerungen in Zusammenhang mit einer Schädigung der Niere festgestellt, wobei deren klinische Bedeutung zu untersuchen bleibt (156–158). So setzen neutrophile Granulozyten Mediatoren frei, die über eine Aktivierung von Komplementfaktoren zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion führen können (159). Im Rahmen einer klassischen Immunkomplex vermittelten Vaskulitis kommt es jedoch zu weitaus deutlicheren Ablagerungen von Immunkomplexen in der Gefäßwand und die, für die AASV so typischen, schweren nekrotisierenden Schädigungen fehlen (160).

5.5.2 Adhäsion der Granulozyten am Endothel ist Voraussetzung für die Modifikation der endothelialen Barriere

Im vorliegenden Modell konnte gezeigt werden, dass eine Blockade des ICAM-1 Rezeptors mit monoklonalen Anti-ICAM-Antikörpern einen Anstieg der Permeabilität an RLEC-Monolayern verhindert. So konnten mit ANCA aktivierte PMN in Anwesenheit blockierender Anti-ICAM-Antikörper keine Schädigung der Barrierenfunktion des Endothels hervorrufen. ICAM-1 vermittelt über eine Bindung an neutrophile β_2 -Integrine die feste Adhäsion von Granulozyten an das Endothel. Die Blockade der neutrophilen Adhäsion hebt den permeabilitätssteigernden Effekt der Interaktion ANCA-Granulozyt-Endothel auf (Abb.15). Somit scheint die ICAM-1 abhängige Adhäsion der PMN Voraussetzung dafür zu sein, dass ANCA aktivierte PMN die endotheliale Integrität schädigen können.

Die Rolle der Adhäsionsmoleküle in Zusammenhang mit PMN-vermittelten Entzündungsreaktionen ist in verschiedenen Studien untersucht worden. So ist der permeabilitätssteigernde Effekt von fMLP-aktivierten Granulozyten in Zusammenhang mit der Pathogenese des Lungenödems bei Ratten durch die Blockade von ICAM-1 aufgehoben worden (70). In einem Sepsis-Maus-Modell war ein deutlich milderer klinischer Bild bei ICAM^{-/-} Mäusen zu beobachten (161). Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen Selektine, ICAM-1 oder β_2 -Integrine reduziert die Transmigration von PMN deutlich (162).

An Extrazellulär-Matrix-Proteinen oder Endothel adhärente Granulozyten zeigen einen erheblich stärkeren „respiratory burst“ nach Stimulation mit TNF α oder fMLP als

Granulozyten in Suspension, auch waren zur Aktivierung adhärenter PMN deutlich geringere Konzentrationen an pro-inflammatorischen Zytokinen (137).

Pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF α oder IL-1 β , stimulieren die endotheliale ICAM-1 Expression (62). So könnten die bei Patienten mit aktiver WG festgestellten erhöhten Serumkonzentrationen an TNF α (163, 164) Einfluss auf die ICAM-1 Expression und die nachfolgende Adhäsion von neutrophilen Granulozyten haben. Neben pro-inflammatorischen Zytokinen steigert PR3 dosis- und zeitabhängig die endotheliale ICAM-1 Expression. PR3, von aktivierten PMN freigesetzt, kann so zu einer verstärkten Adhäsion von Granulozyten und einem Andauern der Entzündungsreaktion beitragen (165).

Die Lunge zeigt im Vergleich zu anderen Organen eine deutlich erhöhte konstitutive Expression vom ICAM-1 (57). Zugleich findet sich ein großer Pool an Leukozyten, die physiologisch in der Mikrozirkulation der Lunge zu finden sind. Die Lunge ist durch einen pro-inflammatorischen endothelialen Phänotyp gekennzeichnet, der durchaus im Sinne eines schnell aktivierbaren Abwehr-Mechanismus verstanden werden kann (166). Auch ist die Transitzeit von PMN in den Lungenkapillaren im Vergleich zu anderen Kapillarsystemen verlängert, ein Prozeß, der ICAM und CD11a/CD18 abhängig ist. Während einer Entzündungsreaktion kommt es zu einer Sequestrierung der PMN in der Lunge, ein Prozeß der mit einer Deformierung der PMN einhergeht (59). Die Bindung von ANCA an den neutrophilen Fc γ RIIa-Rezeptor induziert die Polymerisation von Aktin und führt so zu verminderter Elastizität und nachfolgender möglicher Sequestrierung in Kapillaren, z.B. in der Mikrozirkulation der Lunge (167).

Adhärenente Granulozyten, welche mit Anti-PR3-Antikörpern aktiviert werden, zeigen eine deutlich vermehrte Expression von PR3 auf der Membranoberfläche (115). Das bedeutet, dass ANCA eine Verstärkung der Antigen-Expression auf adhärenenten PMN bewirken können, was zu einem Andauern der Entzündungsreaktion beiträgt und eine mögliche Erklärung der Beschränkung der Entzündungsreaktion auf kleine Gefäße darstellt. Neben dem Adhäsionsmolekül ICAM-1 ist dessen neutrophiler Ligand β_2 -Integrin von Interesse. Eine ANCA-Aktivierung neutrophiler Granulozyten bewirkt eine Veränderung der Konformation des β_2 -Integrin-Rezeptors, was eine verstärkte Interaktion der Rezeptoren und somit festere Bindung der Leukozyten an das Endothel zur Folge hat (168). Zusammenfassend scheint der reziproken Interaktion zwischen Anti-PR3 Antikörpern und aktivierten PMN sowie dem granulozytär-endothelialen β_2 -Integrin/ICAM-1 Komplex eine Schlüsselrolle bezüglich der ANCA-PMN vermittelten Endothelschädigung zuzukommen.

5.5.3 Die granulozytäre ROS-Freisetzung schädigt die endotheliale Integrität

Die während des granulozytären „respiratory burst“ freigesetzten ROS dienen der Mikrobenabwehr. Die Zerstörung des infektiösen Agens geschieht in der Regel intrazellulär. Die Freisetzung von zytotoxischen Molekülen in den Extrazellulärraum kann zur Gewebeschädigung führen (92).

ROS erhöhen die endotheliale Permeabilität und erleichtern so unter anderem die leukozytäre Transmigration. In niedrigen Konzentrationen dienen ROS als wichtige Signalmoleküle, während sie in höheren Konzentrationen Zellschäden und Zelluntergang verursachen. So kommt es bei der Entstehung des ALI/ARDS zu einer vermehrten oxidativen Belastung, in deren Folge es zu Endothelschäden kommt, welche mit der vermehrten ROS Produktion und/oder mit einem Defizit in den lokalen antioxidativen Abwehrmechanismen einhergehen (75).

In unserer Arbeitsgruppe konnte in einem ex-vivo-Ratten-Lungen-Modell gezeigt werden, dass bei der Entstehung der „transfusion-related-acute-lung-injury“ (TRALI) die Antikörper vermittelte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und die nachfolgende Freisetzung von ROS ein mögliches Schlüsselereignis in der pathophysiologischen Kaskade darstellt. (148)

In Zusammenhang mit den AASV werden sowohl granulozytäre ROS als auch Serinproteasen als Verursacher der vaskulären Läsionen und endothelialen Schäden vermutet (109). In meinen akutellen Untersuchungen konnte ich zeigen, dass ANCA neutrophile Granulozyten aktivieren und die Freisetzung von ROS induzieren, wie unter Punkt 4.3 beschrieben.

Im vorliegenden Modell wurde der Einfluss von ROS auf die endotheliale Permeabilität über eine Hemmung der Mediatoren, die für die Bildung der ROS notwendig sind, untersucht. Die ROS Produktion findet in Rahmen einer Kettenreaktion statt. Die NADPH-Oxidase katalysiert die erste Reaktion, bei der das Superoxid-Anion O_2^- entsteht (169). Das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) überführt O_2^- in das weniger aktive Hydrogenperoxid H_2O_2 (92). Sowohl der Einsatz von Diphenyleneiodonium chloride (DPI), welches die Aktivität der NADPH-Oxidase hemmt, als auch der Einsatz von SOD führen zu einer deutlichen Stabilisierung der endothelialen Integrität. So verursacht die Interaktion von ANCA aktivierten Granulozyten und Endothel in Gegenwart von DPI oder SOD keinen Anstieg der Permeabilität von RLEC-Monolayern (Abb.16). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ROS bei der Schädigung der endothelialen Barriere eine wichtige Rolle spielen. Der schädigende Einfluß, den ROS, welche von ANCA aktivierten, neutrophilen Granulozyten

freigesetzt werden, auf das Lungenendothel haben, konnte in unserer Arbeitsgruppe auch an einem ex-vivo-Ratten-Lungen-Modell gezeigt werden, wobei ANCA aktivierte PMN ein Lungenödem auslösten (147).

Der hemmende Effekt von SOD ist, obwohl später enzymatisch wirksam, größer als der von DPI. Dies könnte damit zusammenhängen, dass neben der NADPH-Oxidase noch andere Quellen für das Superoxid-Anion möglich sind. So wurde in der Rattenniere die NO-Synthase als eine Quelle für das Superoxid-Anionen festgestellt (170).

Die zelluläre Antwort der Endothelzelle auf oxidativen Stress zeigt sich in einer vermehrten membranösen Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM oder P-Selektin), in einer Reduktion des Kortikalbandes mit nachfolgender Destabilisierung der „tight-junctions“ und der „adherens-junctions“, vermehrter Stressfaserbildung und verstärkter Phosphorylierung der MLC-Kinase (68). Eine Anspannung des kontraktiven Apparates der Endothelzellen (aktive Kontraktion) und der Zerfall von Zell-Zell-Verbindungen und Zell-Matrix-Adhäsionsmolekülen (passive Retraktion) führen zu Zellabrundung und interendothelialer Spaltenbildung (71, 72).

Die genauen Signaltransduktionswege von ROS abhängigen Änderungen der endothelialen Funktion bleiben noch zu untersuchen. Da der Effekt von pro-inflammatorischen oder permeabilitätssteigernden Substanzen wie Histamin, Thrombin oder TNF α dem von ROS induzierten ähnlich ist, bleibt zu vermuten, dass hierbei viele Übereinstimmungen herrschen. So kann es über OH $^\circ$ -regulierte membranöse Calcium $^{2+}$ (Ca $^{2+}$)-Kanäle oder eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) mit nachfolgender IP3 (Inositol-1,4,5-Trisphosphat) abhängiger Freisetzung von Ca $^{2+}$ aus intrazellulären Speichern zu einem Anstieg der Calcium-Konzentration kommen. Eine H $_2$ O $_2$ oder OH $^\circ$ abhängige Hemmung der Ca $^{2+}$ ATPase führt zu vermindertem Rücktransport von Ca $^{2+}$ aus dem Zytosol in das endoplasmatische Retikulum. Der Ca $^{2+}$ Anstieg korreliert mit einem Anstieg der Permeabilität, ist allein aber nicht ausreichend, um eine Störung der Barrierenfunktion auszulösen (68).

Elastase und PR3 sind potente Induktoren der Apoptose von Endothelzellen, sie werden nach Aktivierung von neutrophilen Granulozyten mit ANCA freigesetzt (171). So konnte in unserer Arbeitsgruppe an einem ex-vivo-Ratten-Lungen-Modell gezeigt werden, dass die Entstehung des ANCA induzierten und PMN vermittelten Lungenödems mit dem Einsatz eines Elastase-Inhibitors verhindert werden kann (147). Im vorliegenden Modell wäre die Überprüfung des Einflusses, den die nach ANCA Aktivierung freigesetzte neutrophile

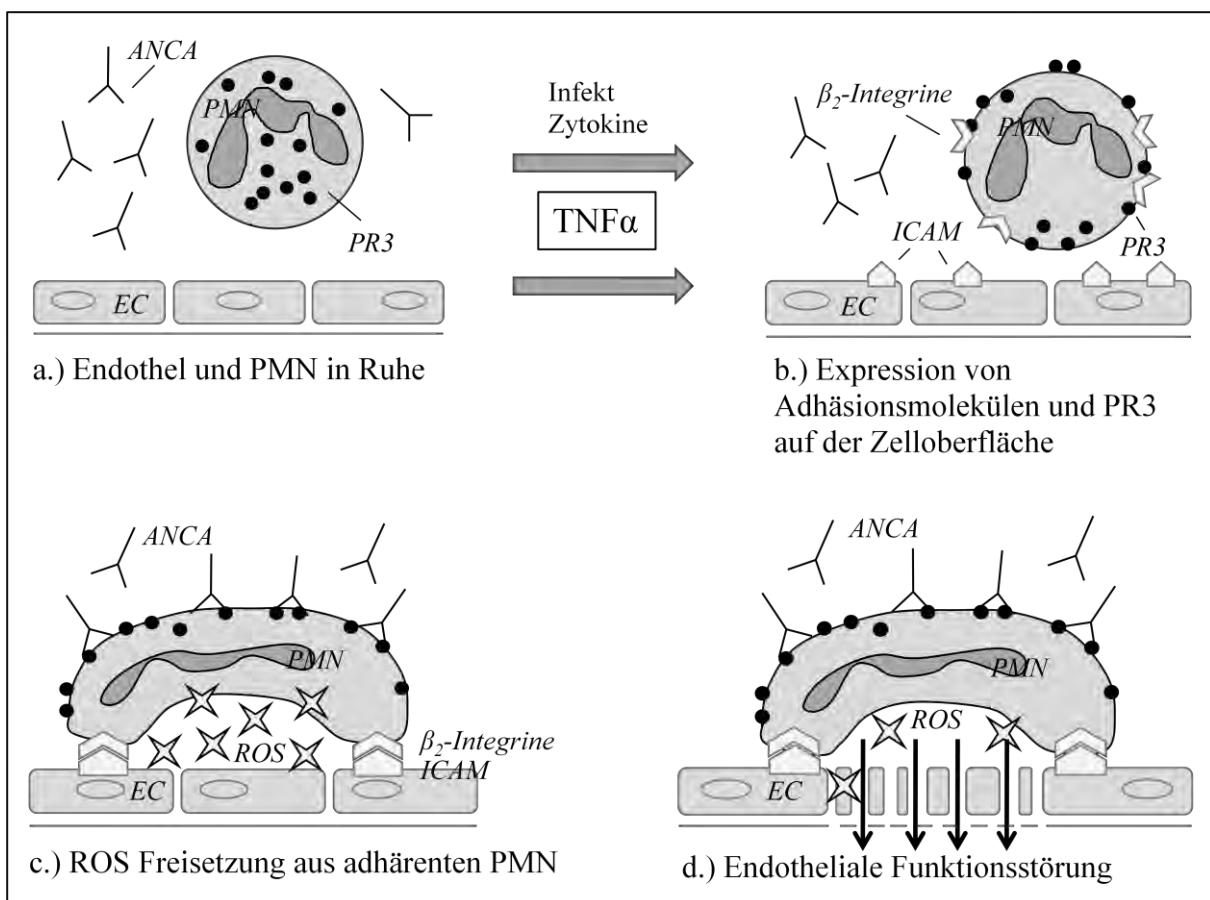
Elastase auf die Endothelfunktion hat, eine Möglichkeit einen weiteren Mechanismus in Zusammenhang mit der Pathogenese der AASV näher zu untersuchen.

5.6 Modell der ANCA abhängigen leukozytär-endothelialen Interaktion

In den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden:

- die Membranexpression von PR3 auf neutrophilen Granulozyten ist aktivierungsabhängig;
- ANCA aktivieren neutrophile Granulozyten und induzieren den respiratory burst *in-vitro*;
- ANCA aktivierte neutrophile Granulozyten induzieren den Anstieg der endothelialen Permeabilität *in-vitro*;
- dieser Effekt ist abhängig von der Adhäsion der Granulozyten am Endothel sowie von der Freisetzung neutrophiler ROS.

Abbildung 17: Modell der „ANCA abhängigen leukozytär-endothelialen Interaktion“



ANCA: „anti-neutrophile cytoplasmatic antibodies“; EC: Endothelzelle; PMN: polymorphkernige Neutrophile; PR3: Proteinase 3; TNF α : Tumor-Nekrose-Faktor α ; ICAM: „intercellular adhesion molecule“; ROS: reaktive Sauerstoffspezies

Im Ruhezustand findet keine Interaktion zwischen ANCA, PMN und Endothel statt (Abb.17a).

Pro-inflammatorische Mediatoren wie $\text{TNF}\alpha$ bewirken die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, was mit einer Translokation der intrazellulär gelegenen Proteinase 3 an die granulozytäre Membranoberfläche einhergeht. Granulozytäre und endotheliale Adhäsionsmoleküle, wie β_2 -Integrine (CD11/CD18) und deren Ligand ICAM-1 werden vermehrt exprimiert (Abb.17b).

Eine feste Adhäsion der Granulozyten am Endothel ist die Folge. ANCA binden an das nun oberflächlich gelegene Zielantigen, die Proteinase 3. Eine vollständige Aktivierung der Granulozyten mit Auslösung des neutrophilen „respiratory burst“ und Freisetzung neutrophilen Granulainhaltes in den granulozytär-endothelialen Spaltraum findet statt (Abb. 17c).

Die freigesetzten Sauerstoffradikale und lysosomalen Enzyme führen zu einer Schädigung der endothelialen Barriere und einem Anstieg der endothelialen Permeabilität. Es kommt zu einem vermehrten Übertritt von Makromolekülen, Leukozyten und Flüssigkeit über die Gefäßwand in das Interstitium (Abb.17d).

6. Zusammenfassung

Die in Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der Wegener'schen Granulomatose, einer systemischen Vaskulitis, regelmäßig nachgewiesenen Auto-Antikörper (ANCA: „anti-neutrophil cytoplasmic antibodies“) aktivieren neutrophile Granulozyten *in-vitro* und induzieren die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und enzymatischer Metaboliten. Neben ihrer diagnostischen Bedeutung wurde so eine pathogenetische Funktion bei der Entstehung der ANCA-assoziierten Vaskulitiden vermutet. In der vorliegenden Arbeit sollte der Effekt der Interaktion von ANCA aktivierten humanen Granulozyten und Endothel auf die endotheliale Barrierefunktion in einem Zweikammer-System untersucht werden, wobei hier die Albumin-Permeabilität verschiedener endothelialer Monolayer als Ausdruck der endothelialen Integrität überprüft wurde.

So konnten ANCA aktivierte Granulozyten bei RLEC („rat lung endothelial cells“)-Monolayern eine Schädigung der endothelialen Barrierefunktion hervorrufen, sichtbar als deutlicher Anstieg der Albumin-Permeabilität. Bei HUVEC („human umbilical vein endothelial cell“) - und RCEC („rat coronary endothelial cell“) - Monolayern konnte kein signifikanter Anstieg der Albumin-Permeabilität induziert werden. Charakteristische Eigenschaften des Endothels, wie die unterschiedliche Empfänglichkeit von mikro- und makrovaskulärem Endothel oder von organspezifischem Endothel auf entzündliche Stimuli zu reagieren, können eine Ursache für die divergierenden Reaktionen der Endothelzell-Monolayer sein. Weiterhin wurde untersucht, über welchen Mechanismus ANCA aktivierte Granulozyten die endotheliale Integrität schädigen. Durch die Blockade des für die feste Bindung der Granulozyten am Endothel entscheidenden endothelialen Adhäsionsmoleküls ICAM-1 wird ein Anstieg der Permeabilität vollständig verhindert. Sowohl eine Hemmung der NADPH-Oxidase mit DPI (Diphenyleneiodium chloride) als auch eine Metabolisierung der reaktiven Sauerstoffspezies durch die Superoxid-Dismutase (SOD) verhindern den permeabilitätssteigernden Effekt von ANCA. SOD hatte eine geringgradig stärker hemmende Wirkung, was damit erklärt werden könnte, dass neben der Bildung über die NADPH-Oxidase noch andere Quellen für reaktive Sauerstoffspezies existieren. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass ANCA, Granulozyten vermittelt, eine deutliche Störung der endothelialen Integrität verursachen. Zudem konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt abhängig von der endothelialen Adhäsion der neutrophilen Granulozyten und der granulozytären Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies ist.

7. Summary

Associated with Wegener`s Granulomatosis, a systemic vasculitis, auto-antibodies (ANCA: „anti-neutrophil cytoplasmic antibodies“) activate neutrophile granulocytes and induce neutrophile release of reactive oxygen species and enzymatic metabolites *in-vitro*. Besides their diagnostic relevance, a pathogenic function in disease development has been postulated. In the present work the impact of the interaction of ANCA-activated human granulocytes and endothelial cells on the endothelial barrier function has been investigated in a two-compartment chamber system. The transendothelial flux of albumin served as an indicator of endothelial integrity.

The confrontation of ANCA-activated granulocytes and RLEC („rat lung endothelial cells“) - monolayer caused a severe damage of endothelial barrier function, apparent as a distinct increase of transendothelial albumin flux. On HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) or RCEC (rat coronary endothelial cell) - monolayer, ANCA-activated granulocytes could not provoke any significant increase of transendothelial albumin flux. Endothelial characteristics, such as the different susceptibility to inflammatory injury, may be underlying the variable endothelial reactions to the interaction with ANCA-activated granulocytes. Next, the mechanisms of ANCA-induced, granulocyte-mediated endothelial damage, were characterized by pharmalogical intervention. Function blocking antibodies targeting ICAM-1, critical for the firm adhesion of granulocytes to the endothelium, prevented the increase of transendothelial Albumin flux. The inhibition of the NADPH oxidase and subsequently generation of reactive oxygen species, with DPI (Diphenyleneiodium chloride), as well as the metabolism of reactive oxygen species with SOD (superoxid dismutase), prevented the ANCA-induced increase in endothelial barrier dysfunction. The mildly stronger inhibiting effect of SOD could be explained by the existence of reactive oxygen species-generating systems beside the NADPH oxidase.

These investigations support the hypothesis that ANCA-activated granulocytes can cause severe endothelial barrier dysfunction. Furthermore it has been demonstrated, that the ANCA effect depends on neutrophile adhesion to the endothelium and the neutrophile release of reactive oxygen species.

8. Literaturverzeichnis

1. Churg, J, Churg, A. Idiopathic and secondary vasculitis: a review. *Mod. Pathol.* 1989;**2**:144–160.
2. Fauci, AS, Haynes, B, Katz, P. The spectrum of vasculitis: clinical, pathologic, immunologic and therapeutic considerations. *Ann. Intern. Med.* 1978;**89**:660–676.
3. Jennette, JC, Falk, RJ, Andrassy, K, Bacon, PA, Churg, J, Gross, WL et al. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum.* 1994;**37**:187–192.
4. Gross, WL. [Primary systemic vasculitis. II: Disease picture]. *Der Internist* 1999;**40**:951-68; quiz 968.
5. Thickett, DR, Richter, AG, Nathani, N, Perkins, GD, Harper, L. Pulmonary manifestations of anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-positive vasculitis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;**45**:261–268.
6. Kallenberg, CGM. Pathogenesis of PR3-ANCA associated vasculitis. *J. Autoimmun.* 2008;**30**:29–36.
7. Sanders, JF, Huitma, MG, Kallenberg, CGM, Stegeman, CA. Prediction of relapses in PR3-ANCA-associated vasculitis by assessing responses of ANCA titres to treatment. *Rheumatology (Oxford)* 2006;**45**:724–729.
8. Rarok, AA, Limburg, PC, Kallenberg, CGM. Neutrophil-activating potential of antineutrophil cytoplasm autoantibodies. *J. Leukoc. Biol.* 2003;**74**:3–15.
9. Kussmaul Adolf, RM. Ueber eine bisher nicht beschriebene eigenthümliche Arterienerkrankung (Periarteriitis nodosa), die mit Morbus Brightii und rapid fortschreitender allgemeiner Muskellähmung einhergeht. *Dtsch Arch Klin Med.* 1866.
10. Cid, MC. New developments in the pathogenesis of systemic vasculitis. *Current opinion in rheumatology* 1996;**8**:1–11.
11. Rees, AJ. Vasculitis and the kidney. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 1996;**5**:273–281.
12. Savage, CO. The interaction of endothelial cells with inflammatory cells in vasculitis. *Sarcoidosis, vasculitis, and diffuse lung diseases : official journal of WASOG / World Association of Sarcoidosis and Other Granulomatous Disorders* 1996;**13**:214–216.
13. Savage, CO, Cooke, SP. The role of the endothelium in systemic vasculitis. *J. Autoimmun.* 1993;**6**:237–249.

14. Davies, DJ, Moran, JE, Niall, JF, Ryan, GB. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology. *British medical journal* (Clinical research ed.) 1982;**285**:606.
15. van der Woude, FJ, Rasmussen, N, Lobatto, S, Wiik, A, Permin, H, van Es, LA et al. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985;**1**:425–429.
16. Falk, RJ, Jennette, JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N. Engl. J. Med.* 1988;**318**:1651–1657.
17. Tervaert, JW, Goldschmeding, R, Elema, JD, dem Borne, AE von, Kallenberg, CG. Antimyeloperoxidase antibodies in the Churg-Strauss syndrome. *Thorax* 1991;**46**:70–71.
18. Lawall, H, Diehm, C. Diagnostik und Therapie von Vaskulitiden: Klinik, Histologie und Immunserologie im Blick. *cardiovasc* 2002;**2** (5):22–33.
19. Wegener Friedrich. Über eine eigenartige rhinogene Granulomatose mit besonderer Beteiligung des Arteriensystems und der Nieren. *Beitr Pathol Anat Allg Pathol.* 1939.
20. Reinhold-Keller, E, Herlyn, K, Wagner-Bastmeyer, R, Gross, WL. Stable incidence of primary systemic vasculitides over five years: results from the German vasculitis register. *Arthritis Rheum.* 2005;**53**:93–99.
21. Lane, SE, Watts, RA, Shepstone, L, Scott, DGI. Primary systemic vasculitis: clinical features and mortality. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* 2005;**98**:97–111.
22. Savage, CO, Harper, L, Adu, D. Primary systemic vasculitis. *Lancet* 1997;**349**:553–558.
23. Hoffman, GS, Kerr, GS, Leavitt, RY, Hallahan, CW, Lebovics, RS, Travis, WD et al. Wegener granulomatosis: an analysis of 158 patients. *Ann. Intern. Med.* 1992;**116**:488–498.
24. Groot, K de, Schnabel, A. [Pulmonary-renal syndrome]. *Der Internist* 2005;**46**:769-81; quiz 782.
25. Falk, RJ, Jennette, JC. ANCA small-vessel vasculitis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1997;**8**:314–322.
26. Luqmani, RA, Flossmann, O. Outcome in small-vessel systemic vasculitis. *J. Rheumatol.* 2006;**33**:1224–1227.
27. Jennette, JC, Thomas, DB, Falk, RJ. Microscopic polyangiitis (microscopic polyarteritis). *Semin Diagn Pathol* 2001;**18**:3–13.

28. Churg, J, STRAUSS, L. Allergic granulomatosis, allergic angiitis, and periarteritis nodosa. *Am. J. Pathol.* 1951;**27**:277–301.
29. Eustace, JA, Nadasdy, T, Choi, M. Disease of the month. The Churg Strauss Syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999;**10**:2048–2055.
30. Noli, C, Scarampella Fabia. *Praktische Dermatologie bei Hund und Katze*. Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH, 2005.
31. Gandini, G, Brini, E, Bellotti, D, Cipone, M. Clinical and clinicopathologic findings in three dogs with steroid-responsive meningitis-arteritis (SRMA). *Vet. Res. Commun.* 2003;**27 Suppl 1**:763–765.
32. Felsburg, PJ, HogenEsch, H, Somberg, RL, Snyder, PW, Glickman, LT. Immunologic abnormalities in canine juvenile polyarteritis syndrome: a naturally occurring animal model of Kawasaki disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1992;**65**:110–118.
33. Carpenter, JL, Moore, FM, Albert, DM. Polyarteritis nodosa and rheumatic heart disease in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1988;**192**:929–932.
34. Ettingers SJ. *Textbook of veterinary internal medicine*. Philadelphia: WB Saunders, 1993.
35. Halliwell REW, GNT. *Veterinary clinical immunology*. Philadelphia: WB Saunders, 1989.
36. Pedersen NC, BJE. Systemic lupus erythematosus in the cat. *Feline Pract* 1991;**19**:5–13.
37. Werner, LL, Gorman, NT. Immune-mediated disorders of cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 1984;**14**:1039–1064.
38. Jennette, JC, Falk, RJ. The role of pathology in the diagnosis of systemic vasculitis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2007;**25**:S52-6.
39. Choi, HK, Liu, S, Merkel, PA, Colditz, GA, Niles, JL. Diagnostic performance of antineutrophil cytoplasmic antibody tests for idiopathic vasculitides: metaanalysis with a focus on antimyeloperoxidase antibodies. *J. Rheumatol.* 2001;**28**:1584–1590.
40. Savige, J, Dimech, W, Fritzler, M, Goeken, J, Hagen, EC, Jennette, JC et al. Addendum to the International Consensus Statement on testing and reporting of antineutrophil cytoplasmic antibodies. Quality control guidelines, comments, and recommendations for testing in other autoimmune diseases. *Am. J. Clin. Pathol.* 2003;**120**:312–318.
41. Hoffman, GS, Specks, U. Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Arthritis Rheum.* 1998;**41**:1521–1537.

42. Talor, MV, Stone, JH, Stebbing, J, Barin, J, Rose, NR, Burek, CL. Antibodies to selected minor target antigens in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). *Clin. Exp. Immunol.* 2007;**150**:42–48.
43. Kallenberg, CG, Brouwer, E, Weening, JJ, Tervaert, JW. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: current diagnostic and pathophysiological potential. *Kidney Int.* 1994;**46**:1–15.
44. Han, WK, Choi, HK, Roth, RM, McCluskey, RT, Niles, JL. Serial ANCA titers: useful tool for prevention of relapses in ANCA-associated vasculitis. *Kidney Int.* 2003;**63**:1079–1085.
45. Finkelstein, JD, Merkel, PA, Schroeder, D, Hoffman, GS, Spiera, R, St Clair, EW et al. Antiproteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies and disease activity in Wegener granulomatosis. *Ann. Intern. Med.* 2007;**147**:611–619.
46. Popa, ER, Stegeman, CA, Bos, NA, Kallenberg, CG, Tervaert, JW. Differential B- and T-cell activation in Wegener's granulomatosis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999;**103**:885–894.
47. Keogh, KA, Ytterberg, SR, Fervenza, FC, Carlson, KA, Schroeder, DR, Specks, U. Rituximab for refractory Wegener's granulomatosis: report of a prospective, open-label pilot trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006;**173**:180–187.
48. Lamprecht, P. Off balance: T-cells in antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitides. *Clin. Exp. Immunol.* 2005;**141**:201–210.
49. Brouwer, E, Stegeman, CA, Huitema, MG, Limburg, PC, Kallenberg, CG. T cell reactivity to proteinase 3 and myeloperoxidase in patients with Wegener's granulomatosis (WG). *Clin. Exp. Immunol.* 1994;**98**:448–453.
50. Griffith, ME, Coulthart, A, Pusey, CD. T cell responses to myeloperoxidase (MPO) and proteinase 3 (PR3) in patients with systemic vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* 1996;**103**:253–258.
51. Popa, ER, Stegeman, CA, Abdulahad, WH, van der Meer, B, Arends, J, Manson, WM et al. Staphylococcal toxic-shock-syndrome-toxin-1 as a risk factor for disease relapse in Wegener's granulomatosis. *Rheumatology (Oxford)* 2007;**46**:1029–1033.
52. Popa, ER, Stegeman, CA, Kallenberg, CGM, Tervaert, JWC. Staphylococcus aureus and Wegener's granulomatosis. *Arthritis Res.* 2002;**4**:77–79.

53. Pendergraft, WF, Preston, GA, Shah, RR, Tropsha, A, Carter, CW, Jennette, JC et al. Autoimmunity is triggered by cPR-3(105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3. *Nat. Med.* 2004;**10**:72–79.
54. Cines, DB, Pollak, ES, Buck, CA, Loscalzo, J, Zimmerman, GA, McEver, RP et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;**91**:3527–3561.
55. Mehta, D, Malik, AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.* 2006;**86**:279–367.
56. Patterson, CE, Lum, H. Update on pulmonary edema: the role and regulation of endothelial barrier function. *Endothelium* 2001;**8**:75–105.
57. Pries, AR, Kuebler, WM. Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 2006;**176**:1–40.
58. Page, C, Rose, M, Yacoub, M, Pigott, R. Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *Am. J. Pathol.* 1992;**141**:673–683.
59. Aird, WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ. Res.* 2007;**100**:174–190.
60. Stevens, T, Garcia, JG, Shasby, DM, Bhattacharya, J, Malik, AB. Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2000;**279**:L419-22.
61. McMurray, RW. Adhesion molecules in autoimmune disease. *Semin. Arthritis Rheum.* 1996;**25**:215–233.
62. Albelda, SM, Smith, CW, Ward, PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 1994;**8**:504–512.
63. Springer, TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;**76**:301–314.
64. Roebuck, KA, Finnegan, A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J. Leukoc. Biol.* 1999;**66**:876–888.
65. Bruce Alberts, AJJLMRKRPW. *Molecular Biology of the Cell*: Garland Science, 2004.
66. Vandenbroucke, E, Mehta, D, Minshall, R, Malik, AB. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008;**1123**:134–145.
67. Dudek, SM, Garcia, JG. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J. Appl. Physiol.* 2001;**91**:1487–1500.
68. Lum, H, Roebuck, KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2001;**280**:C719-41.

69. Garcia, JG, Schaphorst, KL. Regulation of endothelial cell gap formation and paracellular permeability. *J. Investig. Med.* 1995;**43**:117–126.
70. Hu, G, Vogel, SM, Schwartz, DE, Malik, AB, Minshall, RD. Intercellular adhesion molecule-1-dependent neutrophil adhesion to endothelial cells induces caveolae-mediated pulmonary vascular hyperpermeability. *Circ. Res.* 2008;**102**:e120-31.
71. Ingber, DE. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu. Rev. Physiol.* 1997;**59**:575–599.
72. Ingber, DE. Tensegrity and mechanotransduction. *Journal of bodywork and movement therapies* 2008;**12**:198–200.
73. López-Ongil, S, Torrecillas, G, Pérez-Sala, D, González-Santiago, L, Rodríguez-Puyol, M, Rodríguez-Puyol, D. Mechanisms involved in the contraction of endothelial cells by hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* 1999;**26**:501–510.
74. Bogatcheva, NV, Garcia, JGN, Verin, AD. Molecular mechanisms of thrombin-induced endothelial cell permeability. *Biochemistry Mosc.* 2002;**67**:75–84.
75. Orfanos, SE, Mavrommati, I, Korovesi, I, Roussos, C. Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill. *Intensive care medicine* 2004;**30**:1702–1714.
76. Valadon, P, Garnett, JD, Testa, JE, Bauerle, M, Oh, P, Schnitzer, JE. Screening phage display libraries for organ-specific vascular immunotargeting in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;**103**:407–412.
77. King, J, Hamil, T, Creighton, J, Wu, S, Bhat, P, McDonald, F et al. Structural and functional characteristics of lung macro- and microvascular endothelial cell phenotypes. *Microvasc. Res.* 2004;**67**:139–151.
78. Gebb, S, Stevens, T. On lung endothelial cell heterogeneity. *Microvasc. Res.* 2004;**68**:1–12.
79. Kuebler, WM, Goetz, AE. The margined pool. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales européennes* 2002;**34**:92–100.
80. Parker, JC, Yoshikawa, S. Vascular segmental permeabilities at high peak inflation pressure in isolated rat lungs. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2002;**283**:L1203-9.
81. Little, MA, Savage, COS. The role of the endothelium in systemic small vessel vasculitis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2008;**26**:S135-40.

82. Coll-Vinent, B, Cebrián, M, Cid, MC, Font, C, Esparza, J, Juan, M et al. Dynamic pattern of endothelial cell adhesion molecule expression in muscle and perineural vessels from patients with classic polyarteritis nodosa. *Arthritis Rheum.* 1998;**41**:435–444.
83. Donald, KJ, Edwards, RL, McEvoy, JD. An ultrastructural study of the pathogenesis of tissue injury in limited Wegener's granulomatosis. *Pathology* 1976;**8**:161–169.
84. Woywodt, A, Streiber, F, Groot, K de, Regelsberger, H, Haller, H, Haubitz, M. Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. *Lancet* 2003;**361**:206–210.
85. Holmén, C, Elsheikh, E, Stenvinkel, P, Qureshi, AR, Pettersson, E, Jalkanen, S et al. Circulating inflammatory endothelial cells contribute to endothelial progenitor cell dysfunction in patients with vasculitis and kidney involvement. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005;**16**:3110–3120.
86. Nienhuis, HLA, Leeuw, K de, Smit, AJ, Bijzet, J, Stegeman, CA, Kallenberg, CGM et al. Enhanced endothelium-dependent microvascular responses in patients with Wegener's granulomatosis. *J. Rheumatol.* 2007;**34**:1875–1881.
87. Little, MA, Smyth, CL, Yadav, R, Ambrose, L, Cook, HT, Nourshargh, S et al. Antineutrophil cytoplasm antibodies directed against myeloperoxidase augment leukocyte-microvascular interactions in vivo. *Blood* 2005;**106**:2050–2058.
88. Raza, K, Thambyrajah, J, Townend, JN, Exley, AR, Hortas, C, Filer, A et al. Suppression of inflammation in primary systemic vasculitis restores vascular endothelial function: lessons for atherosclerotic disease. *Circulation* 2000;**102**:1470–1472.
89. Filer, AD, Gardner-Medwin, JM, Thambyrajah, J, Raza, K, Carruthers, DM, Stevens, RJ et al. Diffuse endothelial dysfunction is common to ANCA associated systemic vasculitis and polyarteritis nodosa. *Ann. Rheum. Dis.* 2003;**62**:162–167.
90. Moraes, TJ, Zurawska, JH, Downey, GP. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. *Curr. Opin. Hematol.* 2006;**13**:21–27.
91. Witko-Sarsat, V, Rieu, P, Descamps-Latscha, B, Lesavre, P, Halbwachs-Mecarelli, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* 2000;**80**:617–653.
92. Smith, JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leukoc. Biol.* 1994;**56**:672–686.

93. Korkmaz, B, Moreau, T, Gauthier, F. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie* 2008;**90**:227–242.
94. Bainton, DF, Miller, LJ, Kishimoto, TK, Springer, TA. Leukocyte adhesion receptors are stored in peroxidase-negative granules of human neutrophils. *J. Exp. Med.* 1987;**166**:1641–1653.
95. Baldrige, CW, Gerhard R.W. The extra respiration of phagocytosis. *Am. J. Physiol.* 1933;**H 103**:235–236.
96. Lentsch, AB, Ward, PA. Regulation of inflammatory vascular damage. *J. Pathol.* 2000;**190**:343–348.
97. Janeway C.A. *Immunologie*: Verlag Spektrum, Akademischer Verlag HD, B, Oxford, 1997.
98. Bhatia, M, Moomhala, S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J. Pathol.* 2004;**202**:145–156.
99. Torheim, EA, Yndestad, A, Bjerkeli, V, Halvorsen, B, Aukrust, P, Frøland, SS. Increased expression of chemokines in patients with Wegener's granulomatosis - modulating effects of methylprednisolone in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* 2005;**140**:376–383.
100. Huugen, D, Xiao, H, van Esch, A, Falk, RJ, Peutz-Kootstra, CJ, Buurman, WA et al. Aggravation of anti-myeloperoxidase antibody-induced glomerulonephritis by bacterial lipopolysaccharide: role of tumor necrosis factor-alpha. *Am. J. Pathol.* 2005;**167**:47–58.
101. Selvatici, R, Falzarano, S, Mollica, A, Spisani, S. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.* 2006;**534**:1–11.
102. Ye, RD, Boulay, F. Structure and function of leukocyte chemoattractant receptors. *Adv. Pharmacol.* 1997;**39**:221–289.
103. Prossnitz, ER, Ye, RD. The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. *Pharmacol. Ther.* 1997;**74**:73–102.
104. Dillon, SB, Verghese, MW, Snyderman, R. Signal transduction in cells following binding of chemoattractants to membrane receptors. *Virchows Arch., B, Cell Pathol.* 1988;**55**:65–80.
105. Panaro, MA, Mitolo, V. Cellular responses to FMLP challenging: a mini-review. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1999;**21**:397–419.

106. Rossi, F. The O₂⁻-forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanisms of activation and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1986;**853**:65–89.
107. Seifert, R, Schultz, G. The superoxide-forming NADPH oxidase of phagocytes. An enzyme system regulated by multiple mechanisms. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 1991;**117**:1–338.
108. Honeycutt, PJ, Nidel, JE. Cytochalasin B enhancement of the diacylglycerol response in formyl peptide-stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.* 1986;**261**:15900–15905.
109. Harper, L, Savage, CO. Pathogenesis of ANCA-associated systemic vasculitis. *J. Pathol.* 2000;**190**:349–359.
110. Brigham, KL, Meyrick, B. Interactions of granulocytes with the lungs. *Circ. Res.* 1984;**54**:623–635.
111. Hoffman, GS, Sechler, JM, Gallin, JI, Shelhamer, JH, Suffredini, A, Ognibene, FP et al. Bronchoalveolar lavage analysis in Wegener's granulomatosis. A method to study disease pathogenesis. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991;**143**:401–407.
112. Harper, L, Cockwell, P, Adu, D, Savage, CO. Neutrophil priming and apoptosis in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *Kidney Int.* 2001;**59**:1729–1738.
113. Xiao, H, Heeringa, P, Liu, Z, Huugen, D, Hu, P, Maeda, N et al. The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by anti-myeloperoxidase antibodies. *Am. J. Pathol.* 2005;**167**:39–45.
114. Williams, JM, Kamesh, L, Savage, COS. Translating basic science into patient therapy for ANCA-associated small vessel vasculitis. *Clin. Sci.* 2005;**108**:101–112.
115. Brachemi, S, Mambole, A, Fakhouri, F, Mouthon, L, Guillevin, L, Lesavre, P et al. Increased membrane expression of proteinase 3 during neutrophil adhesion in the presence of anti proteinase 3 antibodies. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007;**18**:2330–2339.
116. Komocsi, A, Lamprecht, P, Csernok, E, Mueller, A, Holl-Ulrich, K, Seitzer, U et al. Peripheral blood and granuloma CD4(+)CD28(-) T cells are a major source of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in Wegener's granulomatosis. *Am. J. Pathol.* 2002;**160**:1717–1724.
117. Reumaux, D, Kuijpers, TW, Hordijk, PL, Duthilleul, P, Roos, D. Involvement of Fcγ receptors and β2 integrins in neutrophil activation by anti-proteinase-3 or anti-myeloperoxidase antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 2003;**134**:344–350.

118. Gross, WL, Csernok, E, Flesch, BK. 'Classic' anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (cANCA), 'Wegener's autoantigen' and their immunopathogenic role in Wegener's granulomatosis. *J. Autoimmun.* 1993;**6**:171–184.
119. Bøyum, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand. J. Immunol.* 1976;**Suppl 5**:9–15.
120. Cohen, HJ, Chovaniec, ME. Superoxide production by digitonin-stimulated guinea pig granulocytes. The effects of N-ethyl maleimide, divalent cations; and glycolytic and mitochondrial inhibitors on the activation of the superoxide generating system. *J. Clin. Invest.* 1978;**61**:1088–1096.
121. Jaffe, EA, Nachman, RL, Becker, CG, Minick, CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* 1973;**52**:2745–2756.
122. Piper, HMRSSMAKaHW. *Cell Culture Technique in Heart and Vessel Research.* Microvascular endothelial cells from the heart. Heidelberg: Springer, 1990;p. 158-177.
123. Noll, T, Muhs, A, Besselmann, M, Watanabe, H, Piper, HM. Initiation of hyperpermeability in energy-depleted coronary endothelial monolayers. *Am. J. Physiol.* 1995;**268**:H1462-70.
124. Travis, WD, Hoffman, GS, Leavitt, RY, Pass, HI, Fauci, AS. Surgical pathology of the lung in Wegener's granulomatosis. Review of 87 open lung biopsies from 67 patients. *Am. J. Surg. Pathol.* 1991;**15**:315–333.
125. Charles, LA, Caldas, ML, Falk, RJ, Terrell, RS, Jennette, JC. Antibodies against granule proteins activate neutrophils in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 1991;**50**:539–546.
126. Falk, RJ, Terrell, RS, Charles, LA, Jennette, JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990;**87**:4115–4119.
127. Csernok, E, Ernst, M, Schmitt, W, Bainton, DF, Gross, WL. Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo. *Clin. Exp. Immunol.* 1994;**95**:244–250.
128. Goldschmeding, R, van der Schoot, CE, Bokkel Huinink, D ten, Hack, CE, van den Ende, ME, Kallenberg, CG et al. Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel diisopropylfluorophosphate-binding protein in the lysosomes of normal human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 1989;**84**:1577–1587.

129. Niles, JL, McCluskey, RT, Ahmad, MF, Arnaout, MA. Wegener's granulomatosis autoantigen is a novel neutrophil serine proteinase. *Blood* 1989;**74**:1888–1893.
130. Jennette, JC, Hoidal, JR, Falk, RJ. Specificity of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies for proteinase 3. *Blood* 1990;**75**:2263–2264.
131. Schreiber, A, Busjahn, A, Luft, FC, Kettritz, R. Membrane expression of proteinase 3 is genetically determined. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003;**14**:68–75.
132. Schreiber, A, Luft, FC, Kettritz, R. Membrane proteinase 3 expression and ANCA-induced neutrophil activation. *Kidney Int.* 2004;**65**:2172–2183.
133. Rarok, AA, Stegeman, CA, Limburg, PC, Kallenberg, CGM. Neutrophil membrane expression of proteinase 3 (PR3) is related to relapse in PR3-ANCA-associated vasculitis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002;**13**:2232–2238.
134. Witko-Sarsat, V, Lesavre, P, Lopez, S, Bessou, G, Hieblot, C, Prum, B et al. A large subset of neutrophils expressing membrane proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999;**10**:1224–1233.
135. Sibelius, U, Hattar, K, Schenkel, A, Noll, T, Csernok, E, Gross, WL et al. Wegener's granulomatosis: anti-proteinase 3 antibodies are potent inducers of human endothelial cell signaling and leakage response. *J. Exp. Med.* 1998;**187**:497–503.
136. Mayet, WJ, Csernok, E, Szymkowiak, C, Gross, WL, Zum Meyer Büschenfelde, KH. Human endothelial cells express proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis. *Blood* 1993;**82**:1221–1229.
137. Nathan, CF. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 1987;**80**:1550–1560.
138. Savage, CO, Pottinger, BE, Gaskin, G, Pusey, CD, Pearson, JD. Autoantibodies developing to myeloperoxidase and proteinase 3 in systemic vasculitis stimulate neutrophil cytotoxicity toward cultured endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 1992;**141**:335–342.
139. Shelton, JL, Wang, L, Cepinskas, G, Sandig, M, Inculet, R, McCormack, DG et al. Albumin leak across human pulmonary microvascular vs. umbilical vein endothelial cells under septic conditions. *Microvasc. Res.* 2006;**71**:40–47.
140. Otto, M, Bittinger, F, Kriegsmann, J, Kirkpatrick, CJ. Differential adhesion of polymorphous neutrophilic granulocytes to macro- and microvascular endothelial cells under flow conditions. *Pathobiology* 2001;**69**:159–171.

141. Musser G., CM. Superfamily Muroidea D. E. Wilson D. M. Reeder eds Mammal Species of the World. Washington DC: Smithsonian Institution Press 2005.
142. Jenne, DE, Fröhlich, L, Hummel, AM, Specks, U. Cloning and functional expression of the murine homologue of proteinase 3: implications for the design of murine models of vasculitis. *FEBS Lett.* 1997;**408**:187–190.
143. Buerke, M, Sibelius, U, Grandel, U, Buerke, U, Grimminger, F, Seeger, W et al. *Staphylococcus aureus* alpha toxin mediates polymorphonuclear leukocyte-induced vasocontraction and endothelial dysfunction. *Shock* 2002;**17**:30–35.
144. Mukhopadhyay, S, Hensley, RG, Tazelaar, HD. Cardiac involvement in Wegener granulomatosis diagnosed at autopsy. *Cardiovasc. Pathol.* 2009.
145. Knockaert, DC. Cardiac involvement in systemic inflammatory diseases. *Eur. Heart J.* 2007;**28**:1797–1804.
146. Kumar, A, Cannon, CP. Acute coronary syndromes: diagnosis and management, part I. *Mayo Clin. Proc.* 2009;**84**:917–938.
147. Hattar, K, Oppermann, S, Ankele, C, Weissmann, N, Schermuly, RT, Bohle, RM et al. c-ANCA-induced neutrophil-mediated lung injury: a model of acute Wegener's granulomatosis. *Eur. Respir. J.* 2010;**36**:187–195.
148. Sachs, UJH, Hattar, K, Weissmann, N, Bohle, RM, Weiss, T, Sibelius, U et al. Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood* 2006;**107**:1217–1219.
149. Pfister, H, Ollert, M, Fröhlich, LF, Quintanilla-Martinez, L, Colby, TV, Specks, U et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies against the murine homolog of proteinase 3 (Wegener autoantigen) are pathogenic in vivo. *Blood* 2004;**104**:1411–1418.
150. Aird, WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.* 2007;**100**:158–173.
151. Savage, COS. Endothelium and regulatory cell interactions. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2007;**25**:S46-8.
152. Murphy, HS, Bakopoulos, N, Dame, MK, Varani, J, Ward, PA. Heterogeneity of vascular endothelial cells: differences in susceptibility to neutrophil-mediated injury. *Microvasc. Res.* 1998;**56**:203–211.
153. Mulder, AH, Heeringa, P, Brouwer, E, Limburg, PC, Kallenberg, CG. Activation of granulocytes by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): a Fc gamma RII-dependent process. *Clin. Exp. Immunol.* 1994;**98**:270–278.

154. Williams, JM, Ben-Smith, A, Hewins, P, Dove, SK, Hughes, P, McEwan, R et al. Activation of the G(i) heterotrimeric G protein by ANCA IgG F(ab')₂ fragments is necessary but not sufficient to stimulate the recruitment of those downstream mediators used by intact ANCA IgG. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2003;**14**:661–669.
155. Ben-Smith, A, Dove, SK, Martin, A, Wakelam, MJ, Savage, CO. Antineutrophil cytoplasm autoantibodies from patients with systemic vasculitis activate neutrophils through distinct signaling cascades: comparison with conventional Fcγ receptor ligation. *Blood* 2001;**98**:1448–1455.
156. Xing, G, Chen, M, Liu, G, Heeringa, P, Zhang, J, Zheng, X et al. Complement Activation Is Involved in Renal Damage in Human Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibody Associated Pauci-Immune Vasculitis. *J. Clin. Immunol.* 2009;**3**:282-291.
157. Xiao, H, Schreiber, A, Heeringa, P, Falk, RJ, Jennette, JC. Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am. J. Pathol.* 2007;**170**:52–64.
158. Neumann, I, Regele, H, Kain, R, Birck, R, Meisl, FT. Glomerular immune deposits are associated with increased proteinuria in patients with ANCA-associated crescentic nephritis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003;**18**:524–531.
159. Jennette, JC, Falk, RJ. New insight into the pathogenesis of vasculitis associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Current opinion in rheumatology* 2008;**20**:55–60.
160. Jennette, JC, Xiao, H, Falk, RJ. Pathogenesis of vascular inflammation by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006;**17**:1235–1242.
161. Hildebrand, F, Pape, H, Harwood, P, Müller, K, Hoevel, P, Pütz, C et al. Role of adhesion molecule ICAM in the pathogenesis of polymicrobial sepsis. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2005;**56**:281–290.
162. Smith, CW. Leukocyte-endothelial cell interactions. *Semin. Hematol.* 1993;**30**:45-53; discussion 54-5.
163. Grau, GE, Roux-Lombard, P, Gysler, C, Lambert, C, Lambert, PH, Dayer, JM et al. Serum cytokine changes in systemic vasculitis. *Immunology* 1989;**68**:196–198.
164. Csernok, E, Lüdemann, J, Gross, WL, Bainton, DF. Ultrastructural localization of proteinase 3, the target antigen of anti-cytoplasmic antibodies circulating in Wegener's granulomatosis. *Am. J. Pathol.* 1990;**137**:1113–1120.

165. Taekema-Roelvink, ME, van Kooten, C, Heemskerk, E, Schroeijers, W, Daha, MR. Proteinase 3 interacts with a 111-kD membrane molecule of human umbilical vein endothelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000;**11**:640–648.
166. Kuebler, WM, Goetz, AE. The marginated pool. *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales européennes* 2002;**34**:92–100.
167. Tse, WY, Nash, GB, Hewins, P, Savage, COS, Adu, D. ANCA-induced neutrophil F-actin polymerization: implications for microvascular inflammation. *Kidney Int.* 2005;**67**:130–139.
168. Calderwood, JW, Williams, JM, Morgan, MD, Nash, GB, Savage, COS. ANCA induces beta2 integrin and CXC chemokine-dependent neutrophil-endothelial cell interactions that mimic those of highly cytokine-activated endothelium. *J. Leukoc. Biol.* 2005;**77**:33–43.
169. El-Benna, J, Dang, PM, Gougerot-Pocidalo, M. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Seminars in immunopathology* 2008;**30**:279–289.
170. Satoh, M, Fujimoto, S, Haruna, Y, Arakawa, S, Horike, H, Komai, N et al. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2005;**288**:F1144-52.
171. Yang, JJ, Kettritz, R, Falk, RJ, Jennette, JC, Gaido, ML. Apoptosis of endothelial cells induced by the neutrophil serine proteases proteinase 3 and elastase. *Am. J. Pathol.* 1996;**149**:1617–1626.

9. Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich danken:

Herrn Prof. Dr. Ulf Sibelius für die Bereitstellung des Themas, Herrn Prof. Dr. Seeger für die Bereitstellung meines Promotions-Stipendiums, Frau Dr. Katja Hattar für die freundliche Betreuung und fachliche Beratung während und nach den praktischen Arbeiten an meiner Promotion, Herrn Prof. Dr. Dr. Georg Baljer für die „veterinärmedizinische“ Betreuung meiner Promotion, Herrn Prof. Dr. Thomas Noll für die fachliche Anleitung und die Möglichkeit einen Großteil der Experimente in seinen Laborräumen durchzuführen, Herrn Hermann Holzträger für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für Ihre großzügige und fortwährende Unterstützung in allen Bereichen während des Studiums und der anschließenden Promotion, meiner Freundin für Ihre Geduld und Ihre großzügige Unterstützung während der schriftlichen Zusammenfassung meiner Doktorarbeit.

10. Erklärung:

"Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten."

Catharina Pölzelbauer



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5639-1



9 17 8 3 8 3 5 11 9 5 6 3 9 1